BAND 38, HEFT 4 JUNI 1960

PHYTOPATHOLOGISCHE ZEITSCHRIFT

Begründet von Prof. Dr. E. Schaffnit

Unter Mitwirkung von

Prof. Dr. E. Baldacci, Mailand / Prof. Dr. H. Braun, Bonn / Prof. Dr. W. B. Brierley, Keswick-Cumberland / Prof. Dr. N. Hiratsuka, Tokyo / Oberreg.-Rat i. R. Dr. E. Köhler, Braunschweig / Prof. Dr. K. O. Müller, Canberra / Prof. Dr. H. M. Quanjer, Wageningen / Prof. Dr. T. S. Sadasivan, Madras / Prof. Dr. Tr. Savulescu, Bukarest Prof. Dr. K. Silberschmidt, São Paulo / Prof. Dr. E. C. Stakman, St. Paul

herausgegeben von den Professoren

E. Gäumann Zürich

M. Klinkowski Aschersleben

H. Richter Berlin-Dahlem

Mit 47 Abbildungen

1960

PAUL PAREY IN BERLIN UND HAMBURG

Phytopath. Z. Bd. 38 Heft 4 *S. 321—432 Berlin 1960*

Postverlagsort Berlin

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE 7 JUL 1960

INHALT

Abhandlungen

HOFFMANN, G. M., Untersuchungen über den Stengelbruch und die Stengel- und Blattbräune des Leins (*Polyspora lini* Laff.). Mit 17 Abb. 321

OKU, H., Biochemical studies on *Cochliobolus miyabeanus*. IV. Fungicidal action of polyphenols and the role of polyphenoloxidase of the fungus. With 9 fig. 343

BLUMER, S., Untersuchungen über die Morphologie und Biologie von *Tranzschelia pruni spinosae* (Pers.) Dietel und *T. discolor* (Fuck.) Tranz. et Litv. Mit 9 Abb. 356

LAMPADIUS, F., Beiträge zur Fluorschadendiagnostik. II. Ermittlung fluorhaltiger Immissionen durch Nachweis der Speicherung von Fluor in der Baumrinde 384

GÖTTGENS, E., Untersuchungen über die Entwicklung von *Exobasidium Azaleae* Peck. und seine Infektion der Wirtspflanzen unter besonderer Berücksichtigung der gallenbildenden Wirkstoffe. Mit 10 Abb. 394

Kurze Mitteilung

SCHMELZER, K., und H. O. SCHMIDT, Untersuchungen über eine Mosaikkrankheit an *Viburnum opulus* L. Mit 2 Abb. 427

Besprechungen 431

Manuskripte: In deutscher, englischer, französischer oder italienischer Sprache abgefaßte Originalarbeiten werden druckfertig und möglichst in Schreibmaschinenschrift erbeten. Aufnahme von Tabellen und Abbildungen unterliegt jeweils vorheriger Vereinbarung.
„Kurze Mitteilungen" sind solche Veröffentlichungen in den vorerwähnten Sprachen, die im allgemeinen einen Umfang von vier Druckseiten nicht übersteigen. Sie erscheinen möglichst schon im nächsten Heft.
Die „Besprechungen" erscheinen nur in deutscher Sprache.

Herausgeber: Prof. Dr. E. GÄUMANN, Zürich 6, Universitätsstraße 2, Prof. Dr. M. KLINKOWSKI, Aschersleben, Ermslebener Str. 52, und Prof. Dr. H. RICHTER, Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Str. 19. Zusendung der Manuskripte von Originalarbeiten und „Kurzen Mitteilungen" entweder an den Verlag Paul Parey, Berlin SW 61, Lindenstraße 44/47, oder an einen der drei Herausgeber.
Zusendung der „Besprechungen" unmittelbar an Prof. RICHTER, Berlin-Dahlem. Soweit nicht eine Aufforderung der Herausgeber zur Besprechung bestimmter Arbeiten ergangen ist, empfiehlt es sich, Prof. RICHTER vorher von der Absicht der Besprechung zu verständigen.

Honorierung: Das Mitarbeiterhonorar für Originalarbeiten und „Kurze Mitteilungen" beträgt 32,— DM je Druckbogen von 16 Seiten. Bei Beiträgen von mehr als drei Bogen werden nur die ersten drei Bogen honoriert; Dissertationen und Buchbesprechungen sind honorarfrei.

Sonderdrucke: Jeder Mitarbeiter erhält unberechnet 30 Sonderdrucke seines Beitrages (Originalarbeiten und Kurze Mitteilungen). Mehrbedarf gegen Berechnung.

Vorbehalt aller Rechte, insbesondere auch der photomechanischen Vervielfältigung: Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdrucks und der photomechanischen Wiedergabe sind vorbehalten. Gewerblichen Unternehmen wird die Anfertigung einer photomechanischen Vervielfältigung von Beiträgen oder Beitragsteilen für den innerbetrieblichen Gebrauch durch Photokopie, Mikrokopie und dergleichen, nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens vom 14. 6. 1958, gegen Bezahlung der dort vorgesehenen Gebühr bis zu 3 Exemplaren gestattet. Die Vervielfältigungen haben einen Vermerk über die Quelle und den Vervielfältiger zu tragen. Die in dem Rahmenabkommen vorgesehene Gebühr ist an die Inkassostelle für Photokopiergebühren beim Börsenverein des Deutschen Buchhandels e. V., Frankfurt/M., Gr. Hirschgraben 17-19, zu entrichten. Erfolgt die Entrichtung der Gebühren durch Wertmarken der Inkassostelle, so ist für jedes Photokopierblatt eine Marke im Werte von DM 0,30 zu verwenden. Mit der Überlassung des Manuskriptes überträgt der Verfasser dem Verlag das Recht zu dieser Genehmigung.

Erscheinungsweise: Die Zeitschrift erscheint in zwangloser Folge. Jährlich erscheinen etwa 10—12 Hefte, von denen 4 einen Band bilden. Jeder Band enthält etwa 30 Druckbogen.

Bezugsbedingungen: Der Preis des Bandes richtet sich nach dem Umfang. Er beträgt je Druckbogen von 16 Seiten etwa 3,50 DM. Die Hefte sind auch einzeln käuflich. Das Abonnement verpflichtet zum Bezug eines ganzen Bandes. Es verlängert sich jeweils, falls nicht spätestens unverzüglich nach Eingang der letzten Lieferung des berechneten Bandes Abbestellung erfolgt.

Verlag: Paul Parey, Berlin SW 61, Lindenstraße 44/47, Telefon 61 44 68/69. Printed in Germany (Westberlin).

Abonnementspreis dieses Heftes 27,40 DM **Einzelpreis 30,— DM**

Biologische Zentralanstalt
der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin,
Institut für Phytopathologie Aschersleben
Direktor: Prof. Dr. M. Klinkowski

Untersuchungen über den Stengelbruch und die Stengel- und Blattbräune des Leins (*Polyspora lini* Laff.)

Von

G. M. Hoffmann[1])

Mit 17 Abbildungen

Inhalt: I. Einleitung. — II. Das Krankheitsbild. 1. Blattsymptome; a) Keimblätter, b) Laubblätter; 2. Stengelsymptome; a) Stengelbruch, b) Stengelflecke; 3. Knospen-, Blüten- und Kapselbefall. — III. Untersuchungen über den Erreger *Polyspora lini* Laff. 1. Morphologische Untersuchungen; a) Das Myzel, b) Die Konidien; 2. Die Konidienkeimung; a) Die Konidienquellung, b) Der Keimungsverlauf; 3. Die Abhängigkeit der Konidienkeimung von der Temperatur; 4. Die Abhängigkeit der Konidienkeimung von dem pH-Wert des Mediums; 5. Der Einfluß der Luftfeuchtigkeit auf die Konidienkeimung; 6. Das Wachstum von *Polyspora lini* auf verschiedenen Medien. — IV. Untersuchungen über den Parasitismus von *Polyspora lini*. 1. Infektionsversuche an Keimpflanzen; 2. Infektionsversuche unter Feldbedingungen. — V. Die Überwinterung von *Polyspora lini*. — Zusammenfassung. — Summary. — Literaturverzeichnis.

I. EINLEITUNG

Der Lein (*Linum usitatissimum* L.) ist eine der ältesten Kulturpflanzen und hat auch heute noch, trotz starker Konkurrenz durch die Erzeugung synthetischer Fasern, eine weite Verbreitung. Während er in Nord- und Osteuropa vorwiegend als Faserpflanze gebaut wird, steht in Süd- und Nordamerika, Afrika und Indien die Ölgewinnung im Vordergrund. Der Anbau unterlag in den letzten Jahrzehnten starken Schwankungen. Nach W. Hoffmann (1957) beträgt die Weltanbaufläche gegenwärtig etwa 8,5 Milllionen Hektar. Der Lein gehört zumindest im mitteleuropäischen Raum zu den Kulturpflanzen, deren Anbau durch ein wirtschaftliches Risiko belastet ist. Diese Ertragsunsicherheit kann nicht allein auf spezielle Ansprüche an Boden und Klima oder an Pflege- und Erntemaßnahmen zurückgeführt werden.

[1]) Anschrift: Institut für Pflanzenkrankheiten der Techn. Hochschule Hannover.

Der Lein ist gegen mehrere pilzparasitäre Krankheiten sehr anfällig. Neben der Fusariumwelke (*Fusarium lini*) und *Botrytis* (DE TEMPE 1958) treten in Mitteleuropa die Leinanthraknose (*Colletotrichum lini*) die Leinpustelkrankheit (*Phoma lini*) und der Stengelbruch bzw. die Stengel- und Blattbräune des Leins (*Polyspora lini*) auf. Die letztgenannte Erkrankung führte in Mitteldeutschland, in der CSR und in Polen seit mehreren Jahren in verstärktem Maße zu schweren Schäden, so daß es notwendig erschien, Symptomatologie und Pathogenese der Erkrankung zu untersuchen. Darüber hinaus waren Fragen des Krankheitsverlaufes, der Epidemiologie, insbesondere in Abhängigkeit von Witterungsfaktoren, sowie die Auswirkung des Krankheitsbefalles auf Ertrag und Qualität des Ernteproduktes zu klären. Da eine wirkungsvolle Bekämpfung des Erregers mit chemischen Mitteln unter Feldbedingungen nicht möglich ist, sollten die Untersuchungen einen Einblick geben, in welcher Weise es gelingen könnte, durch pflanzenbauliche Maßnahmen das Auftreten der Krankheit und ihre Schäden in wirtschaftlich erträglichen Grenzen zu halten. Die vorliegende Arbeit stellt den ersten Teil der oben angeführten Untersuchungen dar und beschäftigt sich mit der Symptomatologie und Pathogenese der Erkrankung. Darüber hinaus finden Morphologie, Physiologie und einige Fragen über die Biologie des Erregers Berücksichtigung.

II. DAS KRANKHEITSBILD

Die *Polyspora*-Krankheit des Leins wurde von LAFFERTY (1921) erstmals in Irland gefunden und in ihren Grundzügen beschrieben. Mehrjährige eigene Beobachtungen haben weitere wesentliche Einzelheiten über das Krankheitsbild ergeben und sollen in den folgenden Abschnitten zusammengefaßt werden.

1. Blattsymptome

a) Keimblätter

Die Erfassung des Krankheitsbildes auf den Keimblättern ist bei natürlichem Befall unter Feldbedingungen nur selten möglich, da die Erkrankung meist erst zu einem Zeitpunkt bemerkt wird, an dem die Kotyledonen bereits abgeworfen oder durch Erdflohfraß stark geschädigt sind. Erst nachdem es

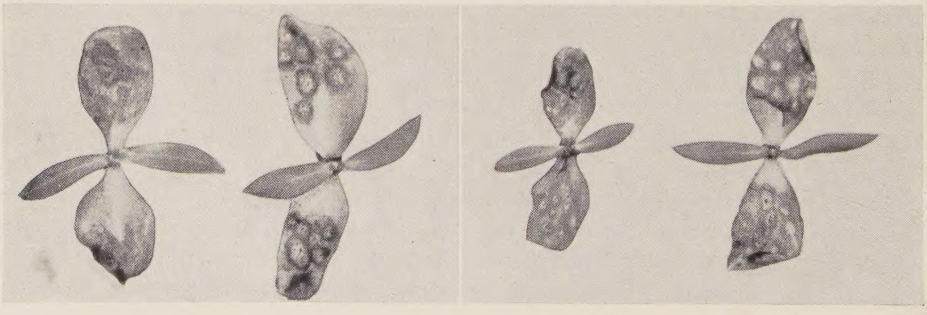

Abb. 1. *Polyspora*-Befall an Kotyledonen. (Künstl. Infektion nach Stichverletzungen)

gelungen war, künstliche Infektionen im Keimblattstadium der Pflanze durchzuführen, konnte ein genaues Bild der Erkrankung ermittelt werden. An Verletzungen der Blattspitze, Blattränder oder der Interkostalfelder entwickelt sich wenige Tage nach der Infektion eine schwach grünlich-grau gefärbte, leicht eingesunkene Gewebezone, die sich deutlich von den gesunden Blattpartien abgrenzt. In kreisförmiger Ausdehnung gewinnt diese langsam an Größe. Innerhalb von 3 bis 4 Tagen ist das Zentrum des Blattfleckes unter Braunfärbung abgestorben und vertrocknet. Eine Chlorose geht der Zerstörung des Gewebes meist nicht voraus. Die befallene Blattpartie ist stark geschrumpft; es kommt oft zu Deformationen des noch gesunden Blatteiles. Bei Fortschreiten der Erkrankung erfaßt diese das gesamte Blatt. Kommt die Infektion zum Stillstand, so tritt meist eine vorzeitige Vergilbung mit anschließendem Abfall der Kotyledonen ein (Abb. 1).

b) Laubblätter

Die Infektion an den Laubblättern beginnt sehr sporadisch am Blattrand, Blattgrund oder über die ganze Spreite verteilt, meist an äußerlich deutlich sichtbaren Fraßverletzungen (Abb. 2). Das Gewebe beginnt, sich hellbraun, später dunkelbraun zu verfärben, sinkt ein und trocknet aus. Unter feuchten Bedingungen siedeln sich leicht Sekundärparasiten (*Alternaria, Stemphylium, Cladosporium* u. a.) an. Erstreckt sich der Befall auf das ganze Blatt oder den Blattgrund, so stirbt dieses rasch ab und bleibt vielfach am Stengel haften. Die Zahl der sich auf einem Laubblatt entwickelnden Blattflecke ist meist gering, jedoch wachsen sich diese zu einer beträchtlichen Größe aus. Durchschnittlich konnten auf stark befallenen Pflanzen 2 bis 3 Befallsstellen je Blatt gezählt werden. Sie erreichen je nach Blattgröße und Ausdehnung bis zu 9 mm und hatten im allgemeinen einen Durchmesser von 4 bis 5 mm. Die beschriebenen Blattsymptome waren über die ganze Pflanze verteilt zu beobachten und erstreckten sich ebenfalls auf die Kelchblätter.

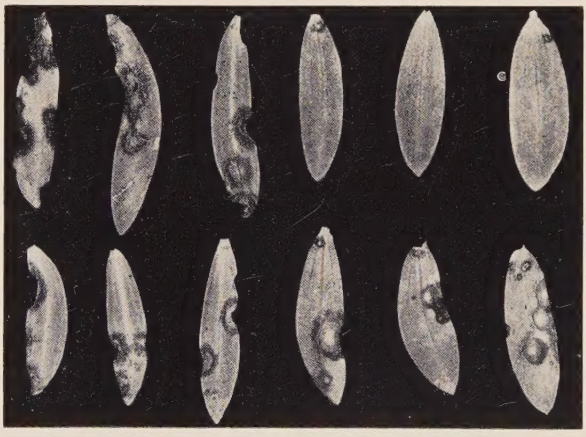

Abb. 2. *Polyspora*-Befall an Laubblättern

Ein Vergleich dieses Befallsbildes mit dem der Leinanthraknose (*Colletotrichum lini*) läßt zwei wesentliche Unterschiede erkennen. Bei *Colletotrichum lini* kann der Krankheitsbefalll an jeder Stelle des Blattgewebes beginnen, ohne daß äußerlich erkennbare Verletzungen vorliegen. Unter günstigen Bedingungen entwickelt sich bei diesem Erreger eine Vielzahl von Primär-

infektionen auf einem Blatt. Der Verlauf des *Colletotrichum*-Befalles erfolgt akut und führt innerhalb weniger Tage zur Verkahlung großer Stengelpartien. Demgegenüber ist bei *Polyspora lini* die Zahl der Primärinfektionen gering, und die Entwicklung der Blattflecke verläuft langsamer.

2. Stengelsymptome

a) Stengelbruch

Unter Feldbedingungen ist im allgemeinen als erstes auffälliges Zeichen der *Polyspora*-Infektion nicht der Blattbefall, sondern ein Stengelbruch in Höhe der Kotyledonen zu beobachten. Diesem geht zunächst eine leichte Stengelbräune in der Nähe des Ansatzpunktes der Keimblätter voraus. Die Bräunungen verstärken sich langsam und führen zu einer Einschnürung und Vermorschung des Gewebes. Hierdurch leidet die Stabilität der Pflanzen wesentlich, und sie brechen nach Wind- oder Regeneinwirkung um (Abb. 3). Derartige Pflanzen liegen verstreut oder nesterweise zwischen den Drillreihen und sind oft nur noch durch einen schmalen Streifen des Rindengewebes mit der Wurzel verbunden. Sie bleiben in ihrer Entwicklung stark zurück und sterben bei frühzeitigem Befall meist vor der Blüte ab. Nach RÜDIGER (1952) entstehen unter dem Einfluß des Pilzbefalles am Stengelgrund sogenannte Lochnekrosen, die durch den Holzkörper bis in das Mark reichen können. Wir beobachteten dagegen weniger ein einseitiges Aufreißen des Gewebes als vielmehr eine oft ringförmige Einschnürung.

Abb. 3. Stengelbruch und -bräune am Ansatz der Kotyledonen

b) Stengelflecke

Die Entwicklung der Stengelflecke erfolgt anfangs analog zu den Blattflecken. Das Rindenparenchym ist leicht eingesunken, dunkelgrüngrau verfärbt und wird später haselnußbraun. Am Rande der Befallsstelle tritt häufig Anthozyanbildung auf. Die Verbräunungen nehmen an Umfang und Intensität rasch zu. Die Flecke vergrößern sich im wesentlichen in der Längsrichtung und gehen bei starkem Befall ineinander über. Die ersten Anzeichen eines Stengelbefalles werden in der Regel an den Ansatzpunkten der Laubblätter beobachtet. Die Infektionen gehen von dem erkrankten Blatt aus und greifen

auf das Stengelgewebe über (Abb. 4). Ein direkter Stengelbefall war in stärkerem Umfang nur am Ende der Vegetationsperiode in den Blütenregionen zu finden. In extremen Fällen sind die Pflanzen total verbräunt. Starke Ausprägung von Einzelflecken führt auch oberhalb der Kotyledonen zu Stengelbruch. Im Bereich der Infloreszenzen tritt bei Spätaussaaten ein Umknicken der Verzweigungen mitunter noch vor der Kapselbildung auf (Abb. 5).

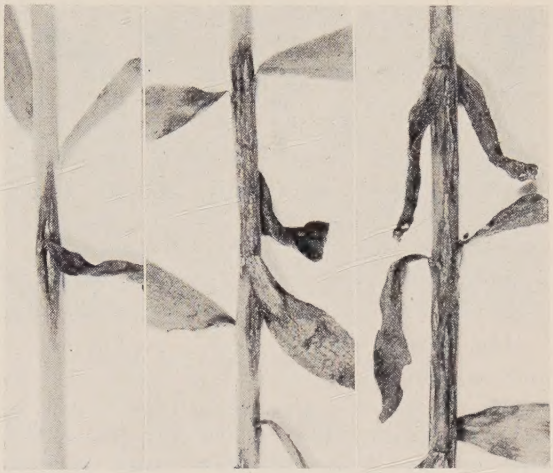

Abb. 4. *Polyspora*-Befall an Leinstengeln

3. Knospen-, Blüten- und Kapselbefall

Bei starkem, frühzeitigem Auftreten der *Polyspora*-Krankheit ist eine Verkümmerung der Knospen durch eine stengelumfassende Ausbreitung der Erkrankung zu beobachten. Die Knospen werden durch den Eingriff des Erregers von der Nährstoffzufuhr abgeschnitten, verkümmern, vertrocknen oder werden von saprophytischen Pilzen besiedelt. Mitunter ist ein direkter Knospenbefall zu beobachten, wobei in erster Linie die Kelchblätter angegriffen werden. In diesen Fällen entfalten sich die Petalen unregelmäßig (Abb. 6). Von den Kelchblättern greift die Erkrankung auf die jungen Kapseln über. Man beobachtet auf diesen anfangs schwach braune Verfärbungen, die sich oft an den Grenzen der Karpelle entlangziehen, diese voneinander trennen und dadurch die Frucht dem Eintritt sekundärer Organismen öffnen. Bei starkem Befall ist die Samenkapsel in kurzer Zeit kaffeebraun verfärbt. Am Rande von Einzelflecken tritt bei früher Infektion Anthozyanbildung auf.

Abb. 5. Stengelbruch und -bräune im Blütenbereich

Der äußerlich sichtbare Kapselbefall gibt keine klare Auskunft über die Ausbreitung der

Abb. 6. Knospen- und Blütenbefall durch *Polyspora lini*

Erkrankung im Fruchtinneren. Bei dem in der Regel auftretenden Spätbefall, kurz vor der Ausreifung der Samen, vermag der Erreger wohl die Kapselwände und auch die Testa zu besiedeln, die normale Entwicklung der Samen wird nicht mehr beeinflußt. In diesen Fällen trügt das gesunde Aussehen einer Samenprobe über die wirkliche Verseuchung durch den Erreger hinweg. Je frühzeitiger die Infektion auf die Frucht übergreift, um so größer können die Schädigungen des Samens werden. Bereits äußerlich geringfügig erscheinende Infekte können auf einzelne Samen übergegangen sein und diese partiell oder vollständig zerstört haben. In extremen Fällen entwickeln sich nur noch taube Samen, deren Inneres vollständig eingeschrumpft und deren Testa von dem Erreger stark besiedelt ist (Abb. 7).

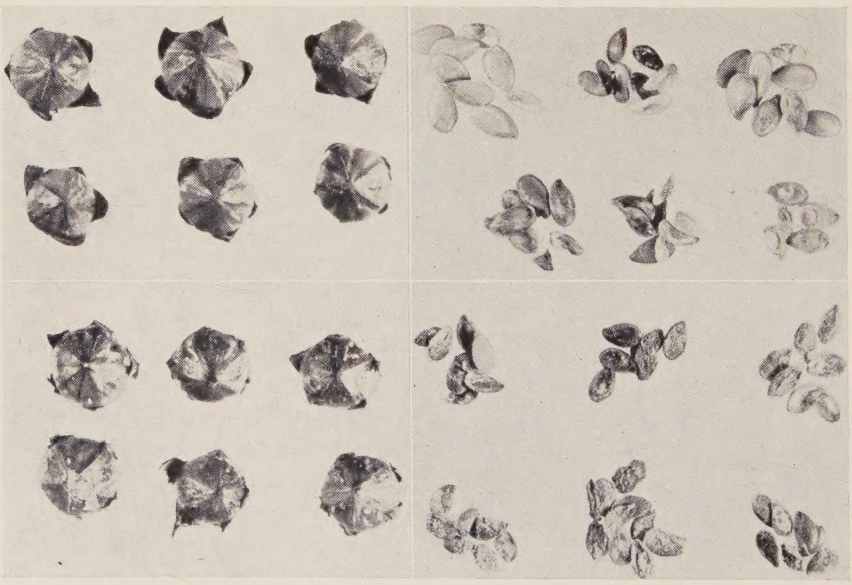

Abb. 7. *Polyspora*-Befall an Kapseln, rechts die darin enthaltenen Samen

III. UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN ERREGER *POLYSPORA LINI* LAFF.

Der Erreger des Stengelbruches, der Stengel- und Blattbräune *Polyspora lini* wurde von LAFFERTY (1921) entdeckt und als bisher einzige Art einer neuen Gattung zu den *Moniliales* gestellt. Während AINSWORTH und BISBY (1954) die Zugehörigkeit zu dieser Familie aufrechterhalten, wird die Gattung *Polyspora* u. a. von PAPE (1932), CLEMENTS und SHEAR (1954), VIENNOT-BOURGIN (1949) in die Familie *Melanconiales* eingeordnet. Ob diese Zuordnung zu Recht besteht, mag hier offenbleiben. Immerhin unterscheidet sich die Art der Sporulation bei *Polyspora lini* sehr deutlich von der Bildung eines Acervulus. Bisher ist nur die Nebenfruchtform des Pilzes bekannt geworden. KRENNER (1954) glaubt die höhere Fruchtform in dem Basidiomyzeten *Microstroma lini* gefunden zu haben und ordnet *Polyspora* in die Familie *Exobasidiaceae* ein. Bisher blieb diese Beobachtung unbestätigt. Nach WHITE (1945) zeigt *Polyspora lini* weitgehende morphologische, physiologische und serologische Übereinstimmungen mit *Pullularia pullulans*. TEMPEL (1958) hat nachgewiesen, daß sich die beiden Organismen mit Hilfe bestimmter serologischer Methoden (Gel-Diffusionsmethode) unterscheiden lassen.

1. Morphologische Untersuchungen

a) Das Myzel

Polyspora lini läßt sich verhältnismäßig einfach auf den gewöhnlichen künstlichen Nährböden kultivieren. Im Gegensatz zu anderen parasitischen Pilzen bleibt die Myzelentwicklung gering. Der Erreger bildet anfangs sternförmige beigefarbene, feuchte Kolonien, die auch nach längerer Kulturzeit klein bleiben. Sie überziehen sich auf den meisten Nährböden rasch mit einer dunkelbraun bis schwarz gefärbten Decke, die aus dickwandigen, stark pigmentierten, kettenartig angeordneten Zellen besteht (Abb. 8). Die Hyphen sind unregelmäßig septiert, stark verzweigt und mitunter leicht angeschwollen. Der Durchmesser einer Keimhyphe beträgt 6 bis 7 μ, das vegetative Myzel erreicht einen Durchmesser von 7 bis 11 μ.

Abb. 8. Kolonien von *Polyspora lini*, auf Malzagar

b) Die Konidien

In künstlicher Kultur bildet der Erreger bereits an wenige Stunden altem Myzel zahlreiche Konidien. Sie entstehen entweder dicht nebeneinander an kurzen, leicht verdickten Konidienträgern oder an normalen Hyphen (Abb. 9).

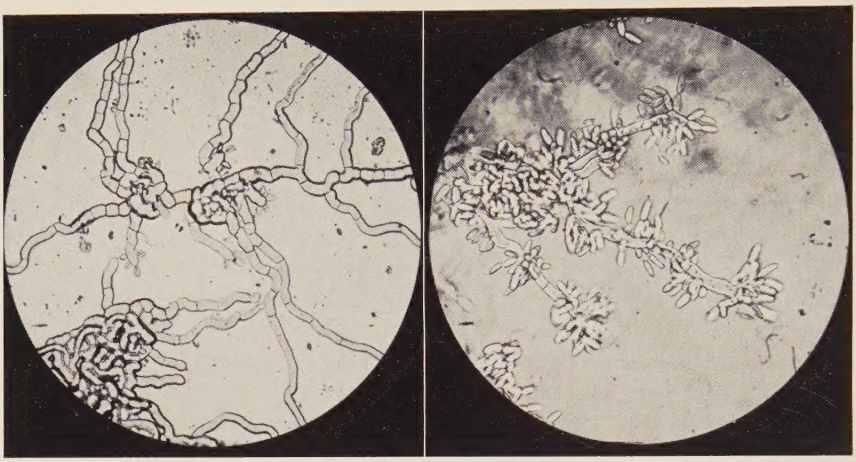

Abb. 9. Myzel und Konidienbildung bei *Polyspora lini*

Ihre Form und Größe unterliegt einer starken Variabilität. Sie sind oval bis länglich mit abgerundeten Enden, mitunter leicht gekrümmt und an einem Polende angeschwollen. Nach LAFFERTY (1921) erreichen die Konidien eine Größe von 9 bis 20 × 4 μ. Die Ergebnisse eigener Messungen an Kulturen des Erregers auf verschiedenen Nährböden sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1

Die Konidiengröße von *Polyspora lini*
(Durchschnitt von 100 Messungen)

Substrat	Länge (μ)	Breite (μ)
Biomalzagar, 24 Stunden Kultur	9,6 ± 0,2	5,2 ± 0,1
Biomalzagar, 6 Tage Kultur	10,8 ± 0,2	5,8 ± 0,1
Tomatenstengel	12,5 ± 0,15	5,1 ± 0,1
Erbsensamen	12,8 ± 0,5	5,3 ± 0,1

2. Die Konidienkeimung

LAFFERTY (1921) beobachtete, daß die Konidien von *Polyspora lini* in sterilem Leitungswasser nicht keimen. In vorangegangenen Untersuchungen (HOFFMANN und FRITZSCHE 1959) erfolgte eine Bestätigung dieses Befundes, wobei sich ergab, daß es zur Auslösung des Keimungsvorganges der stimulierenden Wirkung bestimmter Stoffe bedarf, die u. a. im Zellsaft des Wirtes vorkommen. Für die vorliegenden Untersuchungen wurde eine 3%ige Biomalzlösung als Keimmedium benutzt. Der Keimungsverlauf wurde bei 25 °C in Tröpfchenkulturen auf Deckgläsern beobachtet, die eine feuchte Mikrokammer (BÖTTCHERsche Kammer) abschlossen. Die Konidien wurden aus bis 48 Stunden alten Kulturen entnommen. Bei älteren Kulturen traten Unregelmäßigkeiten während des Keimungsverlaufes auf.

a) Die Konidienquellung

Die Keimung der Konidien wird mit einer Quellungsphase eingeleitet, während der es im allgemeinen innerhalb weniger Stunden zu einer beträchtlichen Vergrößerung des Volumens kommt. Der Grad der Konidienquellung konnte durch Reihenmessungen in bestimmten Zeitintervallen nach Versuchsbeginn quantitativ erfaßt werden. Die in Tabelle 2 zusammengestellten Er-

Tabelle 2

Die Konidienquellung von *Polyspora lini* in Biomalzlösung (3 %) in Abhängigkeit von der Zeit

(Durchschnittliche Konidiengröße; 150 Messungen)

Zeit (Stunden) nach Versuchsbeginn	Länge in μ	Breite in μ
0	10,28 ± 0,29	5,58 ± 0,17
1	10,89 ± 0,12	6,14 ± 0,21
2	12,18 ± 0,33	6,94 ± 0,17
3	12,63 ± 0,46	7,13 ± 0,19
4	12,54 ± 0,40	7,56 ± 0,21
5	13,42 ± 0,37	7,79 ± 0,17
6	13,76 ± 0,36	7,67 ± 0,18
7	13,29 ± 0,33	7,56 ± 0,21

gebnisse lassen erkennen, daß die Quellung der Konidien bereits eine Stunde nach Versuchsbeginn erfaßbar war. Sie erreichte ihr Maximum nach 4 bis 5 Stunden. Innerhalb einer Beobachtungszeit von 7 Stunden nahmen die Längenwerte um 29 %, die Breitenwerte um 38 % zu. Während des Quellungsvorganges wandelt sich vielfach die Gestalt der Konidien ab. Meist bleiben sie längsoval, doch treten Übergänge zu kugeligen Formen hervor. Verschiedentlich beginnt die Quellung einseitig, unipolar. Vor dem Keimbeginn erfolgt häufig eine Septierung, die sich frühzeitig durch eine mediane Einschnürung andeutet. Die Konidienquellung ist wesentlich vom Substrat abhängig. Bei Vergleichsversuchen in sterilem Aqua bidest. bleibt sie nur gering.

b) Der Keimungsverlauf

Der Verlauf der Konidienkeimung ist bei ein- und zweizelligen Formen unterschiedslos. Aus einem oder beiden Polenden tritt eine breite, stumpfe Keimhyphe heraus, die langsam ungerichtet wächst, sich wenig verzweigt und sehr bald zur Konidienbildung übergeht. Das Myzel septiert sich stark, und die einzelnen Zellen runden sich deutlich ab. In Abbildung 10 sind verschiedene Stadien des Keimungsverlaufes bis zur Konidienbildung wiedergegeben. Die Konidienbildung kann bereits 10 Stunden nach Keimbeginn bei 25 °C einsetzen. Die Einzelkonidien keimen am Entstehungsort nicht mit Myzel aus, sondern vermehren sich durch Sprossung, so daß in kurzer Zeit eine Kolonie erwächst, die fast nur aus Konidien zu bestehen scheint.

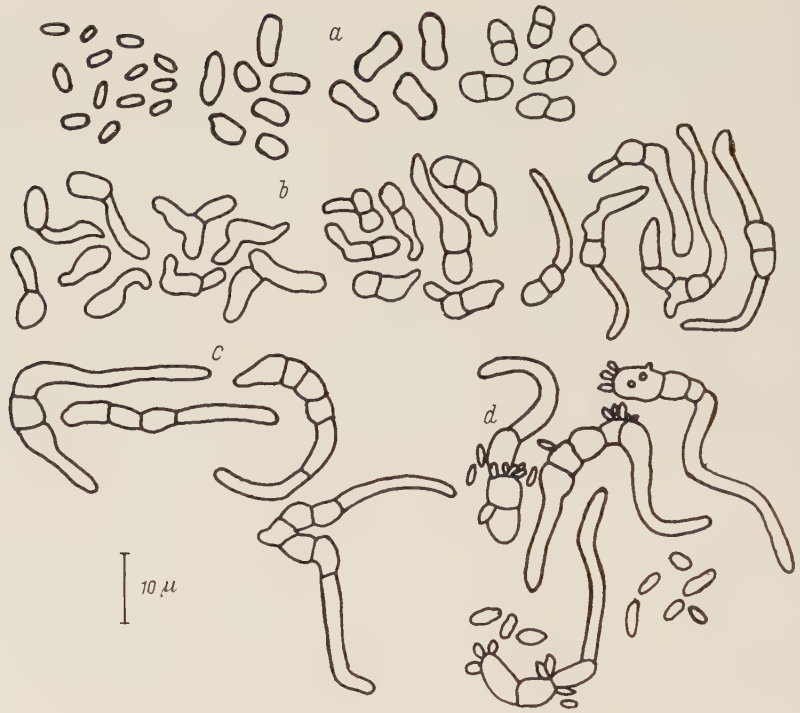

Abb. 10. Verschiedene Entwicklungsstadien von *Polyspora lini*.
a) Quellung; b) Keimung; c) Myzelbildung; d) Konidienbildung

3. Die Abhängigkeit der Konidienkeimung von der Temperatur

Für die späteren, epidemiologischen Untersuchungen war die Ermittlung des Temperatureinflusses auf die Konidienkeimung wesentlich. Die Untersuchungen wurden in der oben angeführten Weise in parallel laufenden Einzelthermostaten bei 7, 15, 18, 20, 25, 28, 30 und 35 °C durchgeführt. Um den optimalen Temperaturbereich deutlicher erfassen zu können, wurden die jeweiligen Keimprozente nach 6, 10, 14 und 24 Stunden ermittelt. Die Ergebnisse einer Versuchsserie sind in Abbildung 11 dargestellt. Die Konidienkeimung von *Polyspora lini* ist innerhalb eines Temperaturbereiches von 7 bis 28 °C möglich. Ein deutliches Optimum zeichnet sich hinsichtlich der Keimschnelligkeit bei 25 °C ab. Bei niederen Temperaturen war der Keimbeginn deutlich verzögert. Während bei 7 °C innerhalb von 14 Stunden die Zahl der gekeimten Konidien gering blieb, konnte bei 15 °C in der gleichen Zeit eine erhebliche Keimung beobachtet werden. Im Bereich höherer Temperaturen zeigte sich ein sehr plötzlicher Abfall in der Keimwilligkeit der Konidien. Innerhalb von 24 Stunden waren bei 28 °C noch 98,4 % der Konidien gekeimt. Bei einer Temperatur von 30 °C war die Keimung völlig gehemmt. Damit müssen frühere Angaben (HOFFMANN und FRITZSCHE 1959) korrigiert werden. Günstige Keimungsbedingungen findet der Erreger innerhalb weniger Stunden in einem Temperaturbereich von 18 bis 28 °C, das Optimum liegt bei 25 °C.

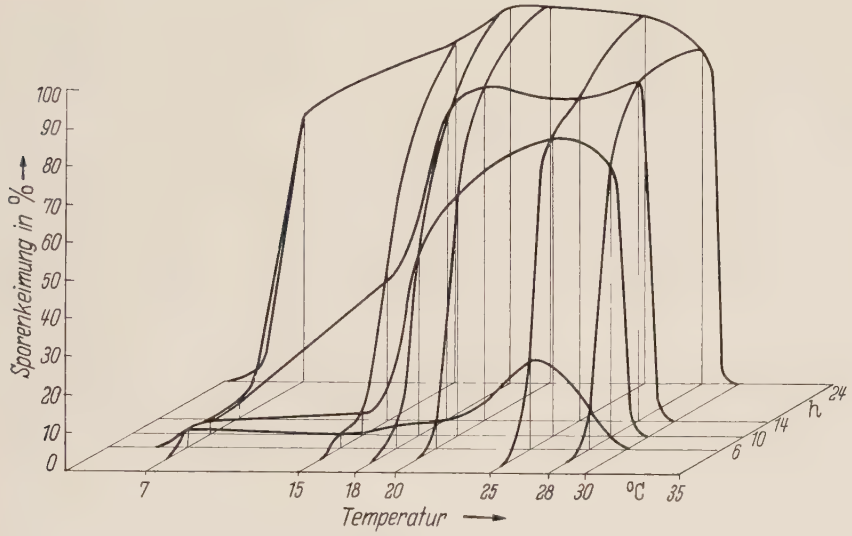

Abb. 11. Die Konidienkeimung von *Polyspora lini* in Abhängigkeit von Zeit und Temperatur

4. Die Abhängigkeit der Konidienkeimung von dem pH-Wert des Mediums

Die bisherigen Keimversuche wurden in einem pH-Bereich von 6,0 bis 6,5 durchgeführt. Die in vorangegangenen Untersuchungen beobachtete Keimung des Erregers in Zellsäften und pflanzlichen Extrakten ließ vermuten, daß der Pilz noch bei niedrigen pH-Werten Entwicklungsmöglichkeiten findet. Die Versuche wurden in 3%iger Malzlösung (Deckglaskulturen) durchgeführt, der im variierten Verhältnis folgende Pufferlösungen zugesetzt wurden:

Salzsäure 0,1 n — Natriumzitrat pH 2, 3, 4;
Prim. Kaliumphosphat — sek. Natriumphosphat pH 5, 6, 7, 8;
Glykokoll — Natronlauge 0,1 n pH 9, 10.

Die Versuchsdauer betrug 16 Stunden bei 25 °C. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 12 dargestellt. Die Konidienkeimung erfolgte innerhalb eines Bereiches von pH 3 bis 10. Ein Keimungsoptimum war bei pH 5 bis 6 feststellbar. Im sauren Bereich war die Keimung deutlich gehemmt. Ein allmählicher Abfall der Keimprozente war im alkalischen Bereich zu beobachten.

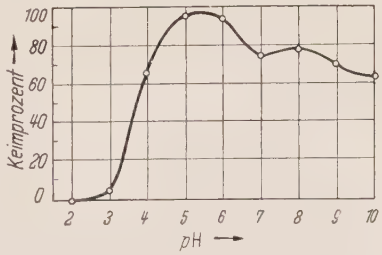

Abb. 12. Die Konidienkeimung von *Polyspora lini* bei verschiedenen pH-Werten des Mediums

5. Der Einfluß der Luftfeuchtigkeit auf die Konidienkeimung

Die starke Quellung der Konidien vor der Keimung ließ darauf schließen, daß *Polyspora lini* zu den hygrophilen Pilzen gerechnet werden kann. Bei einer genauen Untersuchung wurden innerhalb der beschriebenen Mikro-

kammern mit Hilfe einer Konzentrationsabstufung von H_2SO_4 unterschiedliche Luftfeuchtigkeiten eingestellt. Die Konidien wurden in einer Biomalzlösung auf die Deckgläser aufgetragen und mit diesen nach Eintrocknung des Suspensionsmittels die Mikrokammern geschlossen. Die Versuche wurden bei 20 °C durchgeführt und brachten die in Abbildung 13 dargestellten Ergebnisse. Bei 97 und 99 % rel. Luftfeuchtigkeit war nach Ablauf von 6 Stunden bereits ein erheblicher Teil der Konidien gekeimt. Hier ist zu bemerken, daß sich um die Konidien bereits Kondenswasser gebildet hatte. Innerhalb der nächsten Stunden trat eine Kondensation des Wassers ebenfalls bei den niederen Luftfeuchtigkeiten im Bereich der Konidien ein, so daß auch hier, wenn auch deutlich verzögert und unterhalb von 92 %, in geringem Umfang die Konidienkeimung erfolgte. Der Erreger ist auf tropfbar flüssiges Wasser angewiesen und vermag sich unter der Voraussetzung günstiger Temperaturen in einem geeigneten Milieu rasch zu entwickeln.

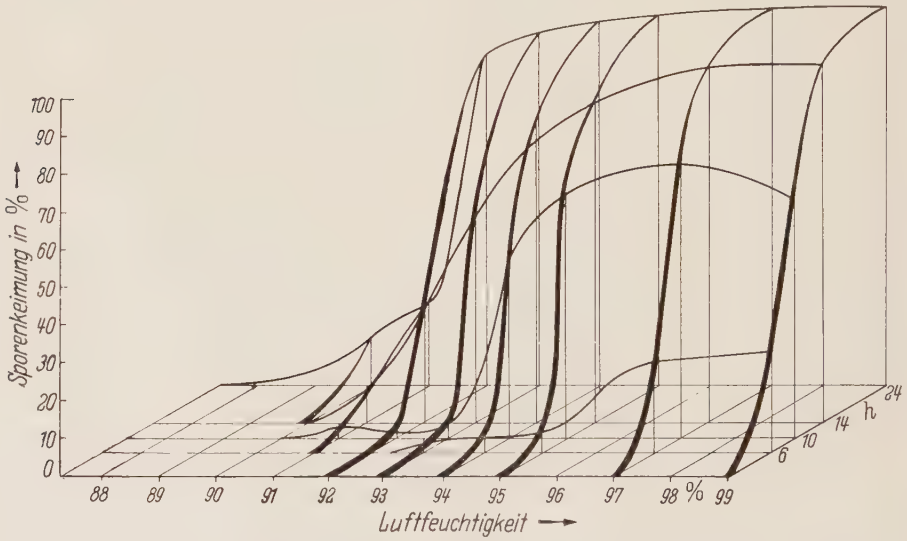

Abb. 13. Die Konidienkeimung in Abhängigkeit von Luftfeuchtigkeit und Zeit (t = 20 °C)

6. Das Wachstum von *Polyspora lini* auf verschiedenen Medien

Nach LAFFERTY (1921) vermag *Polyspora lini* auf den gewöhnlichen Nährböden gut zu wachsen. Die Entwicklung der Kolonien bleibt jedoch gering. HENRY (1934) kultivierte mehrere Herkünfte des Erregers auf Kartoffel-, Maismehl- und Pflaumenagar und stellte deutliche Kulturunterschiede zwischen einzelnen Isolierungen fest. In eigenen Versuchen wurden folgende Nährmedien mit einer Monokonidialkultur von *Polyspora lini* beimpft: Synthetischer Agar, Biomalz-, Melasse-, Möhrensaft-, Bohnendekokt-, Czapek-Dox- und Stärkeagar. Der Pilz vermochte innerhalb von 15 Tagen bei 20 °C auf Stärke- und synthetischem Agar nur kleinere Kolonien zu bilden. Auf den übrigen Medien wurden Koloniengrößen bis zu einem Durchmesser von 30 mm

beobachtet. Es war auffällig, daß sich sehr uneinheitliche Kolonien entwickelten. Auf Möhrensaft-, Melasse- und Czapek-Dox-Agar wurden zahlreiche Sektorenvarianten beobachtet (Abb. 14). Diese unterschieden sich von der Ausgangskolonie durch eine höhere Wachstumsintensität und abweichende Pigmentierung. Die Ausgangskolonie war meist in wenigen Tagen schwarz gefärbt, während die Sektorenvarianten in ihrer Färbung Abstufungen bis zum Verlust der Pigmentbildung zeigten. Diese Inkonstanz in künstlicher Kultur scheint für *Polyspora lini* typisch zu sein.

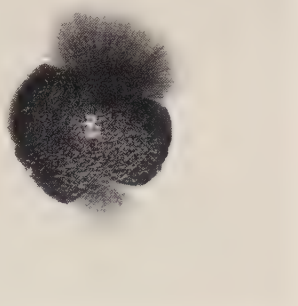

Abb. 14. Sektorenvarianten von *Polyspora lini*

IV. UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN PARASITISMUS VON *POLYSPORA LINI*

1. Infektionsversuche an Keimpflanzen

Über die Ergebnisse von Infektionsversuchen an Keimpflanzen ist an anderer Stelle bereits berichtet worden (Hoffmann und Fritzsche 1959). Histologische Untersuchungen zeigten, daß der Erreger im Blattgewebe, im Gegensatz zur künstlichen Kultur, reichlich Myzel entwickelt. Die auffallend großen, inhaltsreichen Hyphen breiten sich ungerichtet interzellulär aus. Eine Haustorienbildung konnte nicht beobachtet werden. Eine auffallende Konzentration des Myzels war unterhalb der Epidermis festzustellen. Die Ausbreitung der Hyphen erfolgte schneller zwischen Epidermis und Palisadenschicht als im übrigen Blattgewebe. Das Pilzmyzel geht der Zellnekrose voraus. Die Zellen des befallenen Gewebes zeigen anfangs keine Schädigung, später

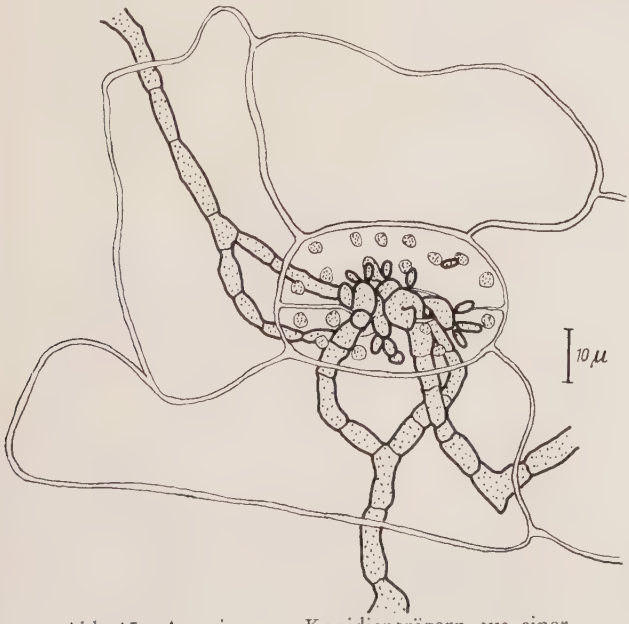

Abb. 15. Austritt von Konidienträgern aus einer Spaltöffnung des Leins

setzt eine Granulierung des Plasmas ein, die Chloroplasten, der übrige Zellinhalt und die Zellwand färben sich braun. Eine Konidienbildung innerhalb des Blattgewebes ließ sich im Gegensatz zu Beobachtungen von LAFFERTY (1921) nicht feststellen. Das Myzel reichert sich in den Vorhöfen der Spaltöffnungen an und treibt durch diese die Konidienträger, an deren stumpfen Enden zahlreiche Konidien gebildet werden (Abb. 15).

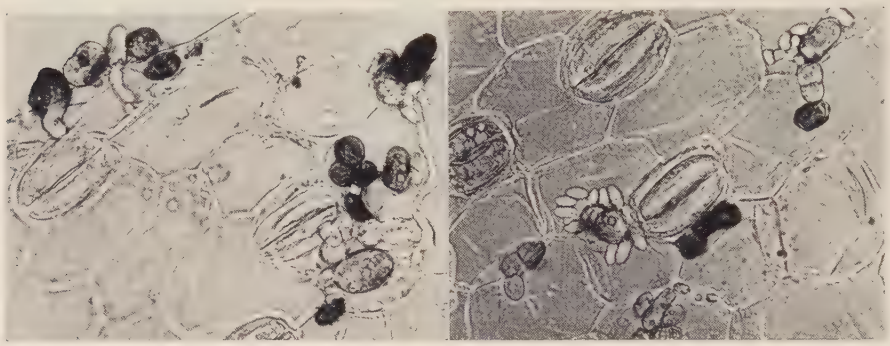

Abb. 16. Konidien von *Polyspora lini* auf unverletzter Leinepidermis

An unverletzten Pflanzen erfolgt keine Infektion. Die Konidien des Erregers waren mehrere Tage nach dem Aufsprühen auf die Blätter noch nachweisbar. In dieser Zeit hatten nur wenige einen kurzen Keimschlauch entwickelt, Appressorienbildung konnte nicht beobachtet werden. In den meisten Fällen hatten sich die Konidien durch Knospung vermehrt oder nach einer Septierung mit einer starken Wand umgeben. Trotz günstiger Feuchtigkeits- und Temperaturbedingungen waren sie in ein Ruhestadium übergegangen (Abb. 16).

2. Infektionsversuche unter Feldbedingungen

Infektionsversuche im Felde unterscheiden sich von Versuchen im Gewächshause dadurch, daß die Pflanzen unter natürlichen Bedingungen aufwachsen und der Erreger den schwankenden Witterungsverhältnissen ausgesetzt ist. Die folgenden Versuche sollten in erster Linie Auskunft über die Dauer der Inkubationszeit unter Feldbedingungen geben. Darüber hinaus waren Beobachtungen über das Fortschreiten der Erkrankung für spätere epidemiologische Studien von Interesse.

In einem Feldversuch wurden 10 Leinsorten in 8 m² großen Parzellen ausgesät und, nachdem die Pflanzen eine Höhe von 10 cm erreicht hatten, wurden Kleinparzellen (60 × 40 cm) durch Übersprühen mit einer Konidiensuspension infiziert. Für 48 Stunden blieben die Pflanzen unter Glaskästen, die mit feuchtem Filtrierpapier ausgelegt waren. Die ersten Anzeichen eines Infektionserfolges konnten nach 10 Tagen in Form von Blattflecken beob-

achtet werden. Erste deutliche Stengelsymptome traten nach 14 Tagen auf. Nach 20 Tagen war ein Höhepunkt des Krankheitsbefalles erreicht (Abb. 17). Die untersten sechs Blattpaare waren meist völlig zerstört, vertrocknet und teilweise abgefallen. In diesem Bereich befanden sich auch die Stengelflecke. Einzelne Pflanzen waren an den Befallsstellen umgebrochen.

Eine quantitative Auswertung des Versuches erfolgte 20 Tage nach der Infektion. Die Bewertung des Befallsgrades der Einzelpflanzen wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

0 = ohne deutliche Krankheitssymptome,
I = Blattflecke an Laubblättern vereinzelt,
II = Blattflecke an Laubblättern mäßig,
III = Blattflecke an Laubblättern stark,

\+ = Stengelflecke vereinzelt,
\+ + = Stengelflecke mäßig,
\+ + + = Stengelflecke stark.

Aus den Kleinparzellen wurde jeweils die Hälfte des Pflanzenbestandes ausgewertet. Die Pflanzenzahl war bei den einzelnen Sorten entsprechend der Bestandesdichte unterschiedlich und betrug in jedem Falle über 100.

Von einer Bewertung des Kotyledonenbefalles wurde abgesehen, da diese auch an den Kontrollpflanzen durch Erdflohfraß stark geschädigt, zum Teil bereits abgefallen waren. Die in Tabelle 3 zusammengefaßten Ergebnisse zeigen, daß die Blätter und Stengel der infizierten Pflanzen teilweise stark erkrankt waren. Höchsten Krankheitsbefall zeigten die Sorten „Lusatia", „Löbauer Blau", „Flachskopf" und „Endress Öllein". Die Erkrankung war bei den Sorten „Belgischer Faserlein", „Bernburg Stamm 26" und „Bernburg Stamm 112" wesentlich geringer.

Abb. 17. *Polyspora*-Befall an Feldpflanzen (künstliche Infektion)

Der Infektionsversuch wurde zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt, nachdem die Pflanzen eine durchschnittliche Höhe von 35 cm hatten. Nach einer Inkubationszeit von 12 bis 14 Tagen konnten an den infizierten Pflanzen starke Blatt- und Stengelsymptome beobachtet werden. Die Infektion

war angegangen und verlief wie bei dem ersten Versuch. Die obenerwähnten Sortenunterschiede ließen sich wiederum feststellen.

Eine weitere Auswertung des ersten Infektionsversuches erfolgte an reifen Pflanzen bei der Ernte, um das Endstadium der Erkrankung zu erfassen. Zu diesem Zeitpunkt waren die Blätter abgefallen, so daß sich die Bewertung des Krankheitsbefalles auf die Wurzelhals- und Stengelsymptome beschränkte. Für die Beurteilung der Wurzelhalssymptome wurde folgendes Schema gewählt:

I = leichte Wurzelhalsbräune,
II = starke Wurzelhalsbräune,
III = Einschnürung im Bereich des Wurzelhalses,
IV = Stengelbruch.

Die Stengelsymptome wurden entsprechend den früheren Angaben (S. 335) gewertet. Eine Auswertung der Kontrollparzellen erfolgte nicht, da sich die Krankheit in der Zwischenzeit weiter verbreitet hatte und in diesem Zu-

Tabelle 4

Keimlingsinfektionen mit *Polyspora lini* unter Feldbedingungen

Sorte bzw. Zuchtstamm		Krankheitsbefall in %							
		Blattbefall				Stengelbefall			
		0	I	II	III	0	+	++	+++
Löbauer Blau	infiziert	4	29	32	35	11	36,0	33,0	20,0
	Kontrolle	83,5	14,5	1,0	1,0	96,9	3,1	—	—
Bernburger Ölfaser	infiziert	1,9	48,2	41,3	8,6	27,7	67,2	1,7	3,4
	Kontrolle	89,5	10,5	—	—	100,0	—	—	—
Endress Öllein	infiziert	5,9	32,0	31,0	31,1	33,3	45,8	19,6	1,3
	Kontrolle	97,1	2,9	—	—	100	—	—	—
Lusatia	infiziert	5,0	10,0	37,0	48,0	13,0	7,0	30,0	50,0
	Kontrolle	86,5	11,3	2,2	—	100	—	—	—
Flachskopf	infiziert	7,8	21,1	34,6	36,5	27,1	15,3	21,1	36,5
	Kontrolle	80,1	16,0	1,3	2,6	97,4	1,3	—	—
Fasertreu	infiziert	8,0	34,0	41,0	17,0	32.0	48,0	16,0	4,0
	Kontrolle	86,0	14,0	—	—	100	—	—	—
Belgischer Faserlein	infiziert	3,0	76,0	10,0	1,0	64,0	35,0	—	1,0
	Kontrolle	91,0	9,0	—	—	100	—	—	—
Bernburg 26	infiziert	11,0	68,0	20,0	1,0	85,0	15,0	—	—
	Kontrolle	85,0	15,0	—	—	100	—	—	—
Bernburg 76	infiziert	7,0	37,0	42,0	14,0	47,0	46,0	4,0	3,0
	Kontrolle	100	—	—	—	100	—	—	—
Bernburg 112	infiziert	6,0	69,0	25,0	—	81,0	19,0	—	—
	Kontrolle	84,0	16,0	—	—	100	—	—	—

sammenhang nur das Fortschreiten der Krankheit an den künstlich infizierten Pflanzen interessierte.

Ein Teil der Pflanzen war vor der natürlichen Reife abgestorben und teilweise von sekundären Schwächeparasiten so weit besiedelt, daß eine Auswertung des Stengelbefalles nicht mehr möglich war. Der Grund für diese Absterbeerscheinungen mag in vielen Fällen auf einen *Polyspora*-Stengelbruch zurückgehen, jedoch kann auch an eine Schädigung durch die Larven der Leinerdflöhe gedacht werden. Die Zahl der abgestorbenen Pflanzen wurde daher gesondert ermittelt. Die in Tabelle 4 zusammengestellten Ergebnisse zeigen, daß die Sorten „Löbauer Blau", „Endress Öllein", „Lusatia" und „Fasertreu" einen starken Stengelbruchbefall aufwiesen. Die Sorten „Belgischer Faserlein" und die Zuchtstämme „Bernburg 26" und „Bernburg 112" waren auffallend gesund geblieben, bzw. der Stengelbefall hatte nicht das Ausmaß wie bei den übrigen Sorten erreicht. Bei den anfälligen Sorten war das Stroh so weit geschädigt, daß die Qualität stark gelitten hatte.

Tabelle 5

Krankheitsbefall zur Erntezeit nach Infektion im Sämlingsstadium

Sorte bzw. Zuchtstamm	Zahl der Pflanzen			Wurzelhalsbefall %					Stengelbefall %			
	Gesamt	ausgewertet	abgestorben	0	I	II	III	IV	0	+	++	+++
Löbauer Blau	296	162	134	—	—	18,6	25,9	55,5	7,4	1,2	9,4	82,0
Endress Öllein	117	56	61	—	3,5	12,7	42,8	41,0	5,5	10,7	16,0	67,8
Lusatia	229	86	133	14,1	3,4	15,1	48,8	18,6	5,9	26,7	9,3	58,1
Flachskopf	118	81	37	29,7	6,1	38 2	18,5	7,5	28,5	44,4	4,9	22,2
Fasertreu	336	288	48	9,7	16,7	20,1	36,5	19,7	13,0	3,7	9,3	75,0
Belgischer Faserlein	220	200	20	94	1,5	1,5	2,5	0,5	40,0	46,0	10,5	3,5
Bernburg 26	224	200	24	97,5	—	1,0	1,5	—	52,5	37,0	10,5	—
Bernburg 76	207	200	7	100	—	—	—	—	5,0	12,5	33,0	49,5
Bernburg 112	239	200	39	100	—	—	—	—	20,0	50,0	24,0	6,0

Die Infektionsversuche unter Feldbedingungen zeigten, daß die Erkrankung eine Inkubationszeit von etwa 10 bis 12 Tagen besitzt. Nach 20 Tagen tritt ein erster Höhepunkt des Krankheitsbefalles, der auf die Primärinfektionen zurückgeht, ein. Die Symptome verstärken sich, zum Teil durch Sekundärbefall, bis zur Erntezeit wesentlich, und es kommt bei anfälligen Sorten zu einem erheblichen Stengelbruch. Die Sortenanfälligkeit ist unterschiedlich. Nach unseren bisherigen Kenntnissen trat die Krankheit unter Feldbedingungen meist erst nach der Blütezeit auf. Die Infektionsversuche haben gezeigt, daß unter günstigen Bedingungen der Befall wesentlich früher einsetzen kann und dabei zu erheblichen Schäden führt.

V. DIE ÜBERWINTERUNG VON *POLYSPORA LINI*

Seitdem LAFFERTY (1921) die Übertragbarkeit von *Polyspora lini* mit dem Saatgut feststellte, wird allgemein angenommen, daß der normale Weg der Überwinterung des Erregers über die Sameninfektion führt. Er vermag bei ausgereiftem, äußerlich gesund erscheinendem Saatgut in den äußeren Schichten der Testa ein Ruhemyzel zu bilden, welches bei trockener Aufbewahrung des Samens mehrere Jahre überdauern kann. Weitere Überwinterungsmöglichkeiten sind bisher noch nicht untersucht worden. Der Wirtskreis von *Polyspora lini* scheint begrenzt zu sein und sich im wesentlichen auf Vertreter der Gattung *Linum* zu beschränken. Eigene Infektionsversuche mit dem Erreger an Gramineen, Leguminosen, Solanaceen, Cucurbitaceen und Chenopodiaceen verliefen negativ. Eine Überwinterung auf Unkräutern ist daher wenig wahrscheinlich. Obgleich beobachtet werden konnte, daß *Polyspora lini* auf erkranktem Leinstroh, welches von Dezember bis Anfang Mai ungeschützt im Freiland aufgehängt wurde, überwintern kann und unter der Voraussetzung günstiger Umweltbedingungen in wenigen Tagen sehr reichlich seine Vermehrungsorgane (Konidien) entwickelt, kann diese Überwinterungsart nur in besonderen Fällen von Bedeutung sein. Bei dem normalen Ernteprozeß bleiben Pflanzenreste, wenn überhaupt, nur in geringem Umfange über den Winter hinaus oberirdisch liegen. Dagegen werden an Stengelbruch erkrankte Pflanzen bei der Ernte nicht erfaßt und später untergepflügt. Es war daher zu untersuchen, ob *Polyspora lini* in Analogie zu *Fusarium lini* im Boden überdauern kann oder zumindest auf erkrankten Pflanzenteilen im Boden während der Vegetationsruhe lebensfähig bleibt.

Zur Klärung der ersten Frage wurden im Autoklaven sterilisierte und unsterile Bodenproben in 200-ml-Erlenmeyerkolben mit einer Konidiensuspension infiziert und bei 10 °C aufbewahrt. Die Reisolierungsversuche nach 6 und 12 Tagen, wobei eine Bodensuspension auf Malzagarplatten übertragen wurde, ergaben, daß sich der Erreger in steriler Erde lebensfähig erhalten kann, in unsteriler Erde aber nach wenigen Tagen bereits nicht mehr nachweisbar ist. Die in gut verschlossenen Erlenmeyerkolben aufbewahrten Erdproben wurden unter Freilandbedingungen eingegraben. Reisolierungsversuche im folgenden Frühjahr zeigten, daß der Pilz die Temperaturschwankungen des Winters in steriler Erde überdauern kann.

In gleicher Weise wurden Überwinterungsversuche mit von *Polyspora lini* stark befallenen Stengelproben durchgeführt. Auf den in unsteriler Erde unter Freilandbedingungen aufbewahrten Pflanzenresten war der Erreger noch nach fünf Monaten nachweisbar. Nach diesen Untersuchungen vermag der Erreger im Boden auf Pflanzenresten zu überwintern, gehört jedoch nicht zu den eigentlichen Bodenmikroorganismen. Derartig erkrankte Pflanzenreste können im Frühjahr durch die Bodenbearbeitungsmaßnahmen an die Oberfläche gelangen von wo aus die gebildeten Vermehrungsorgane des Pilzes verbreitet werden. Unter mitteleuropäischen Verhältnissen dürfte dieser Art der Überwinterung nur eine geringe Bedeutung beizumessen sein. Unter der Voraussetzung eines ausgedehnten Leinanbaues darf dieser Faktor hingegen nicht übersehen werden.

Zusammenfassung

1. Die Stengelbruch-, Stengel- und Blattbräunekrankheit (*Polyspora lini* Laff.) gehört in Mittel- und Osteuropa zu den wichtigsten Erkrankungen des Leins. Die Krankheitssymptome an Keim- und Laubblättern, Stengeln, Knospen, Blüten und Samenkapseln werden eingehend beschrieben. Die Blattinfektionen beginnen meist an deutlich sichtbaren Fraßverletzungen. Die Erkrankung des Stengels erfolgt vielfach auf dem Umweg über die Laubblattinfektion. Starker Stengelbefall führt auch oberhalb der Kotyledonen zu Stengelbruch. Knospenbefall führt zu Verkümmerungen, mitunter wird die Entfaltung der Petalen gestört. Bei frühzeitiger Infektion der Kapseln werden die Samenanlagen zerstört, äußerlich geringfügig erscheinender Kapselbefall kann bei Frühinfektionen weitgehend auf die Samen übergegriffen haben.

2. *Polyspora lini* läßt sich auf den gewöhnlichen künstlichen Nährböden gut kultivieren. Die Konidiengröße beträgt 9,6 bis 12,8 × 5,1 bis 5,8 μ. Die Konidien leiten ihren Keimungsvorgang mit einer starken Quellung ein. Sie verändern dabei ihre Gestalt, verschiedentlich erfolgt vor der Bildung des Keimschlauches eine Septierung. In künstlicher Kultur bleibt die Myzelentwicklung gering. Wenige Stunden nach der Keimung bilden sich an den kurzen, wenig verzweigten, stark septierten Hyphen zahlreiche Konidien.

Das Temperaturoptimum der Konidienkeimung liegt bei 25 °C. Günstige Keimungsbedingungen findet *Polyspora lini* innerhalb weniger Stunden in einem Temperaturbereich von 12 bis 28 °C. Der Erreger keimt nur bei hoher Luftfeuchtigkeit und ist auf eine H-Ionenkonzentration des Mediums von über pH 3 angewiesen. Auf künstlichen Nährböden bleiben die Kolonien von geringer Größe. Es konnten zahlreiche Sektorenvarianten beobachtet werden.

3. *Polyspora lini* wächst im Blattgewebe des Leins interzellulär. Sein Myzel breitet sich zwischen Epidermis und Palisadenschicht schneller als im übrigen Blattgewebe aus. Haustorienbildung wurde nicht beobachtet. Auf unverletzten Laubblättern keimen die Konidien nicht oder in sehr geringem Umfange aus. Die kurzen Keimschläuche können nicht in das Blatt eindringen. Eine Appressorienbildung war nicht zu beobachten. Die Konidien vermehren sich auf dem Blatt durch Knospung, quellen und umgeben sich nach Septierung mit einer dunkel gefärbten, stärkeren Zellwand.

4. Infektionsversuche unter Freilandbedingungen in verschiedenen Entwicklungsstadien der Pflanzen ergaben, daß die Krankheit eine Inkubationszeit von 10 bis 12 Tagen besitzt. Nach 20 Tagen ist ein Höhepunkt der Erkrankung erreicht. Bis zur Erntezeit war durch Sekundärbefall der größte Teil der Pflanzen schwer geschädigt. Die Sortenanfälligkeit gegen *Polyspora lini* ist unterschiedlich. „Belgischer Faserlein" und die Zuchtstämme „Bernburg 26" und „Bernburg 112" wurden nur in geringem Umfang befallen, jedoch bedürfen diese einjährigen Versuche weiterer Bestätigung.

5. *Polyspora lini* vermag sich in unsteriler Erde nicht zu entwickeln. Auf erkrankten Pflanzenresten kann der Erreger die Vegetationsruhe im Erdboden überdauern.

Summary

1. Stem break and stem and leaf browning (*Polyspora lini* Laff.) is one of the most important diseases of flax in Central and Eastern Europe. The disease symptoms on the cotyledons and foliage leaves, stems, buds, flowers and capsules are described in detail. Leaf infections begin mostly with clearly visible incisive wounds. Infection of the stem frequently occurs indirectly through the infection of the foliage leaves. Heavy stem infection leads also to fracture of the stem above the cotyledons. Bud infection leads to deformed flowers, one of the effects being the failure of the petals to unfold. Early infection of the capsules causes a destruction of the seed primordia and capsule infections that appear negligible externally may be transferred extensively to the seeds if they occur in the early stages.

2. *Polyspora lini* can be cultivated easily on the usual artificial substrates. The size of the conidia is 9.6 — 12.8 × 5.1 — 5.8 μ. The conidia swell markedly when they begin to germinate. In so doing they change their form and various forms of septa are produced before the formation of a germ tube. In artificial culture the mycelial development remains limited. A few hours after germination numerous conidia are formed on short, highly septated hyphae with infrequent branching.

The optimum temperature for germination of the conidia is 25 °C. After a few hours *Polyspora lini* will continue its germination successfully at 18 to 25 °C. The pathogen germinates only at high atmospheric humidity and requires a hydrogen-ion concentration of more than pH 3 in the medium. On artificial media the colonies remain small. Numerous sectorial variants could be observed.

3. *Polyspora lini* grows intercellularly in the leaf tissue of flax. Its mycelium extends between the epidermis and the palisade layer more rapidly than in other leaf tissues. No formation of haustoria was observed. On unwounded foliage leaves the conidia germinate only slightly or not at all. The short germ tubes are unable to penetrate into the leaf. No formation of appressoria could be observed. The conidia multiply on the leaf by budding, after which the swell and after the formation of septa become surrounded with a strong dark-coloured cell wall.

4. Infection experiments under natural conditions and at different stages of development of the plant showed that the disease has an incubation time of 10 to 12 days. The disease reaches its climax after 20 days. By the time of harvesting the majority of the plants had become diseased through secondary infections. Varieties vary in susceptibility to *Polyspora lini*. Belgian Linen flax and the breeding lines Bernburg 26 and Bernburg 112 were attacked only slightly but these experiments, which were made in only one year, require confirmation.

5. *Polyspora lini* was not capable of multiplying in non-sterilized soil. The pathogen can maintain itself on diseased plant remains during the resting period.

Literaturverzeichnis

Ainsworth, G. C., and G. R. Bisby, 1954: A dictionary of the fungi. Comm. mycol. inst. Kew, Surrey, 4. Aufl.

Clements, F. E., and C. L. Shear, 1954: The genera of fungi. Hafner Publ. New York.

Henry, A. W., 1934: Observations on the variability of *Polyspora lini*. Canad. J. Res. **10**, 409—413.

Hoffmann, G. M., und R. Fritzsche, 1959: Erdflohfraß und Infektion des Leins durch *Polyspora lini*. Phytopath. Z. **34**, 398—410.

Hoffmann, W., 1957: Flachs- und Hanfbau. Bauernverlag, Berlin.

Krenner, J. A., 1954: Über die Stengelbruchkrankheit des Flachses. Agrârtùd. egy. **6**, 1—2.

Lafferty, H. A., 1921: The browning and "stem-break" disease of cultivated flax (*Linum usitatissimum*), caused by *Polyspora lini* n. gen. et spec. Sci. proc. royal Dublin Soc. **16**, 248—274.

Pape, H., 1932: Melanconiales. In Handbuch der Pflanzenkrankheiten, Bd. III, 494—577, Parey, Berlin.

Rüdiger, W., 1952: Zur pathologischen Anatomie des Leins. Phytopath. Z. **19**, 34—47.

Tempe, J. de, 1958: Lijnzaadinfecties, hun bepaling, belang en bestrijding. Jvsl. Rijksproefst. Zaadcontr. Wageningen, 1956—57, S. 67—70.

Tempel, A., 1958: On serological differences between *Polyspora lini* and *Pullularia pullulans*. T. Planteziekt. **64**, 482—484.

Viennot-Bourgin, G., 1949: Les champignons parasites des plantes cultivées. Masson, Paris.

White, N. H., 1945: The relation of *Polyspora lini* Lafferty and *Pullularia pullulans* (de Bary) Bertch to flax browning. J. Austr. sci. ind. res. **18**, 141—149.

Takamine Laboratory, Sankyo Co., Ltd. Shinagawa, Tokyo, Japan

Biochemical studies on *Cochliobolus miyabeanus*

IV. Fungicidal action of polyphenols and the role of polyphenoloxidase of the fungus

By

H. Oku

With 9 figures

INTRODUCTION

It has been demonstrated by many workers that the polyphenols in plant tissues are closely concerning with the disease resistance of the host plants (3, 6, 7, 9, 10, 13, 14, 19). Recently the reviews in this field were summarized by Farkas and Király (1), Király and Farkas (5).

In the previous paper (11), the author mentioned that *Cochliobolus miyabeanus*, pathogenic fungus of leaf blight disease of rice plant, contains a polyphenoloxidase of the laccase type, and its mycelial growth is inhibited by various polyphenols including the polyphenols extracted from rice plant.

Wakimoto and Yoshii (19) reported that the resistant varieties of rice plant against blast fungus contain larger quantities of polyphenols than the susceptible varieties, and the polyphenol contents in the leaves infected not only with the blast fungus but with leaf blight fungus were remarkably increased.

From these facts, it is conceivable that the resistance of host plant against the leaf blight fungus might be due to polyphenols which are contained in the rice tissue or produced by infection of the pathogenic fungus.

It is well known that the oxidation products of polyphenols are highly toxic substances. Many discussion has, therefore, been made on the formation of oxidation products of polyphenols from the point of an argument on the polyphenol-polyphenoloxidase or peroxidase system of the host plants (4, 16, 18), but little attention has been paid to the oxidizing enzymes in pathogenic fungi.

The present studies are designed to clarify the role of polyphenoloxidase of this fungus to the fungistatic action of polyphenols, in other words "the self inhibition", and to clarify the influence of biological reducing agents on the polyphenol-polyphenoloxidase system.

MATERIALS AND METHODS

A strain of *Cochliobolus miyabeanus* maintained in this laboratory was grown on the potato-sucrose-agar media for 10—14 days, and used in experiments.

Spore-germination test. — Placed 0.5 ml of chemicals, 2 ml of M/15 phosphate buffer (pH 6.9) and 1 ml of spore suspension into each test tube, and made the total volume to 5 ml with distilled water. Test tubes were incubated at 27 °C for 4 hours, and after the spores were killed by addition of one drop of Lugol-solution, spores sinked in the bottoms of test tubes were provided for the microscopic observations.

Extraction of chlorogenic acid. — Chlorogenic acid was extracted from coffee beans by FREUDENBERG's method (2). Melting point of chlorogenic acid obtained was 203—205 °C.

Tests for the mycelial growth. — The mycelia were grown on the sterilized potato-sucrose agar for 5 days at 26 °C, and the diameters were measured.

Preparation of polyphenoloxidase. — *C. miyabeanus* was grown in a shaking-flask containing 100 ml of the modified Czapek medium (11). After 4-day incubation at 26 °C, mycelia were harvested and washed with distilled water. Then they were placed into the ice-cold water (0—3 °C), and homogenized in Waring blendor. They were filtered through a Büchner funnel and the filtrate was salted out with $(NH_4)_2SO_4$ in 80 % saturation. The precipitates were collected by filtration and dissolved in distilled water and dialized against distilled water for overnight at 2 °C. The resulted clear solution was diluted as to uptake 6 μl oxygen per ml per minute at 30 °C when M/20 catechol was used as a substrate, and was supplied as the enzyme solution of polyphenoloxidase.

Measurement of ultraviolet absorption. — Measurements of optical density of a specific wave length were carried out with Shimadzu spectrophotometer, and for the measurements of the absorption spectra, Beckman model DK-2 spectrophotometer was used. The cells of the spectrophotometer were filled with the solution containing polyphenol solution, M/15 phosphate buffer at pH 6.9, enzyme solution and reducing agents (or H_2O) (1 : 3 : 1 : 1).

RESULTS

1. The influence of Na-diethyldithiocarbamate (DDC) on the toxicity of catechol against the mycelial growth

Toxicity of catechol against the mycelial growth of *C. miyabeanus* is shown in Table 1. Catechol inhibited the mycelial growth almost completely at the concentration of 3×10^{-3} M, and the brown pigmentation of the media was observed. However, the toxicity of catechol and the pigmentation

were eliminated by addition of an adequate quantity of DDC, inhibitor of the Cu-enzymes.

These facts suggest that the polyphenoloxidase (Cu-enzyme) of this fungus plays an important role in the toxic action of the polyphenol against the fungus and that the oxidized products are more toxic than the polyphenols themselves.

Table 1

Influence of Na-diethyldithiocarbamate (DDC) on the toxicity of catechol to the mycelial growth

Conc. of DDC (M)	Concentration of catechol (M)					
	0		3×10^{-3}		10^{-3}	
	Diam. of mycelium (mm)	Pigmentation of medium	Diam. of mycelium (mm)	Pigmentation of medium	Diam. of mycelium (mm)	Pigmentation of medium
0	48	—	±	+++	12	+
2×10^{-2}	0	—	0	—	0	—
10^{-2}	14	—	19	—	18	—
5×10^{-3}	17	—	21	—	23	—
2.5×10^{-3}	19	—	4	—	22	—
1.25×10^{-3}	22	—	+	+++	18	—
6×10^{-4}	24	—	±	+++	16	±

2. The influence of ascorbic acid and glutathione (GSH) on the toxicity of catechol

If the toxicity of the polyphenol is due to the quinone produced by the fungal polyphenoloxidase, the toxicity must be diminished by reduction of quinone to phenol, or by inactivation of quinone with SH-compounds.

Table 2

Influence of ascorbic acid and glutathione on the toxicity of catechol against the spore germination

(Data are shown in percent germination)

Chemicals	Concentration of chemicals (M)			
	0 %	3×10^{-3} %	10^{-3} %	3×10^{-4} %
Catechol	79.6	5.3	11.5	18.3
Catechol + ascorbic acid (1 : 1) ..	79.6	38.6	78.8	92.8
Ascorbic acid	79.6	94.0	96.5	96.5
Catechol + glutathione (1 : 1) ..	79.6	81.0	77.4	68.3
Glutathione	79.6	85.2	81.2	89.7

As is shown in Table 2, the toxicity of catechol against spore germination was decreased by the addition of ascorbic acid or glutathione.

3. Toxicity of brown substance produced from the oxidation of catechol

From the above results, it was found that the toxicity of catechol is due to the oxidation product(s). However, since o-benzoquinone is very unstable and polymerizes into the melanine-like brown substance, catechol was oxidized by the enzyme preparation of *C. miyabeanus* for 5 days at 26 °C, and the resulted brown substance was used for the spore germination experiment.

Table 3

Effect of brown substance (melanine-like substance), produced from the enzymatic oxidation of catechol, on the spore germination

(Data are shown in percent germination)

Chemicals	Concentration of chemicals (M)			
	0 %	3×10^{-3} %	10^{-3} %	3×10^{-4} %
Catechol	89.5	4.9	26.0	35.6
Brown substance*) + ascorbic acid**) ..	89.5	0	85.5	94.5

*) Concentration of brown substance was shown in the concentration of original catechol.

**) Ascorbic acid was added to brown substance in order to reduce unchanged quinone.

The results are given in Table 3. Thus, the spore germination of *C. miyabeanus* was also inhibited by the melanine-like brown substance, i. e. the polymer of o-benzoquinone.

4. Substrate concentration and polyphenoloxidase activity

As was shown in Table 2, the percent germination of the spores of *C. miyabeanus* in catechol solution did not increase remarkably by dilution of the solution.

Figure 1 shows the influence of substrate concentration on the oxygen uptake of *Cochliobolus* polyphenoloxidase. The amount of the substrate oxidized by the enzyme increased with increasing substrate concentration to a certain extent, but no further increase was observed. These results also suggest that the toxicity of polyphenols against spore germination of this fungus are due to the oxidation products of polyphenols, and the amounts of the oxidation products depend upon the concentration of the spore polyphenoloxidase.

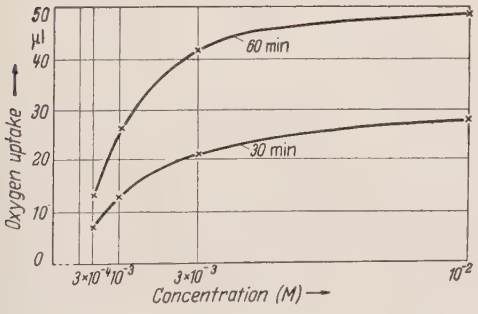

Fig. 1. Influence of substrate concentration on the activity of polyphenoloxidase of *C. miyabeanus*. Substrate: catechol. Temperature: at 30 °C

5. Influence of ascorbic acid and glutathione on the oxidation of chlorogenic acid by spores

A presumption was made for the mechanism of fungicidal action of polyphenols on *C. miyabeanus* that polyphenols are oxidized to corresponding quinones and the polymers by the fungal polyphenoloxidase, and the fungus is killed by the oxidation products. In other words, *C. miyabeanus* kills himself because of the high polyphenoloxidase activity.

In this experiment the author observed how the polyphenols are oxidized by the living conidia of *Cochliobolus*. Chlorogenic acid was employed as a polyphenol. The absorption spectrum of chlorogenic acid and the oxidized product has been reported by SISLER and EVANS (15). The absorption of chlorogenic acid exhibits a peak at 326 mμ and the absorbance decreases by oxidation.

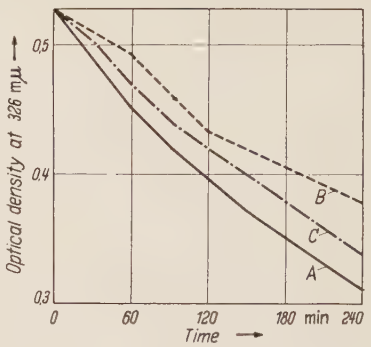

Fig. 2. Oxidation of chlorogenic acid by the conidia of *C. miyabeanus* and the influence of ascorbic acid and glutathione. A. 3×10^{-5} M chlorogenic acid + 1 mg of conidia. B. A + 3×10^{-4} M ascorbic acid. C. A + 3×10^{-4} M glutathione

Figure 2 shows the conidial oxidation of chlorogenic acid. The decrease in absorbance at 326 mμ became slow when an adequate amount of ascorbic acid or glutathione was added to the same solution.

If ascorbic acid reduces the oxidized chlorogenic acid completely to the original reduced state, decrease in absorbance should not be observed.

6. Influence of ascorbic acid or glutathione on the chemical oxidation of polyphenols

It is a general belief that quinones are reduced by ascorbic acid to the corresponding phenols. But in Figure 2 a decrease of chlorogenic acid took place even in the solution containing ascorbic acid. This causes a necessity to ascertain whether the oxidized chlorogenic acid is to be completely reduced by ascorbic acid to the reduced form.

For this purpose, the chlorogenic acid was oxidized by iodine and the recovery of the optical density at 326 mμ by an addition of ascorbic acid was observed.

The results were given in Figure 3. Chlorogenic acid was oxidized rapidly by iodine and the both peaks at 294 mμ and 326 mμ disappeared. The addition of ascorbic acid into the reaction mixture as soon as the oxidation established resulted in an increased optical density at 326 mμ to the original

state. Undoubtedly this increase was caused by the complete reduction of oxidized chlorogenic acid. But when glutathione was added to the oxidized chlorogenic acid, the recovery of the optical density at 326 mμ was not complete, and the shoulder at 294 mμ did not recover. This suggests that a new compound other than the original chlorogenic acid was formed with the simultaneous reduction of the quinone.

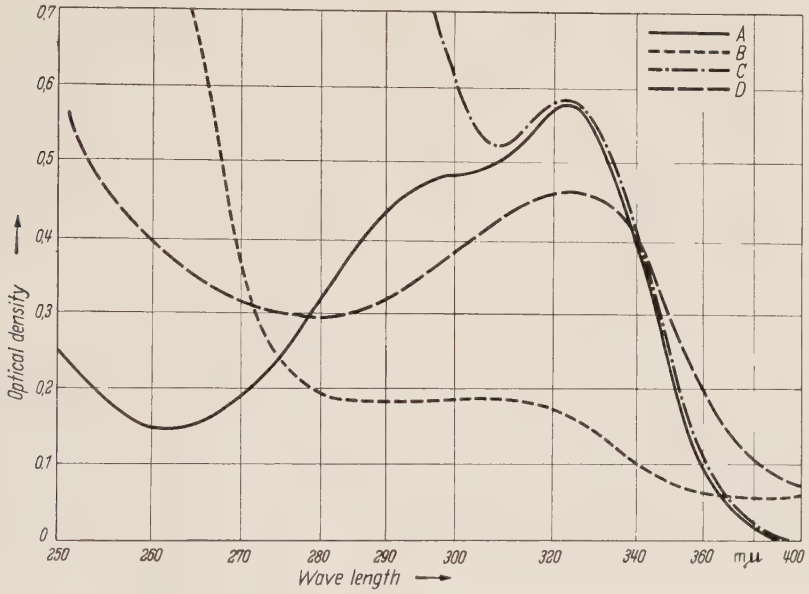

Fig. 3. Absorption spectra of chlorogenic acid and the chemical oxidation product and the influence of ascorbic acid and glutathione. A: 3×10^{-5} M chlorogenic acid. B: A + 3×10^{-5} M iodine. C: B + 0.25 mg of ascorbic acid. D: B + 0.25 mg of glutathione

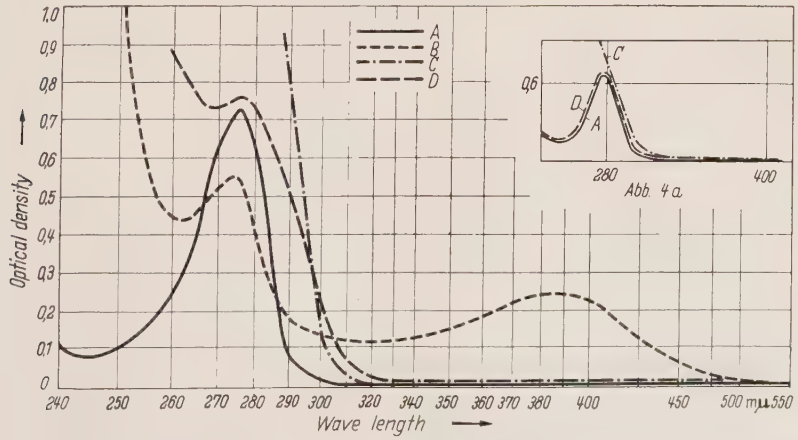

Fig. 4. Absorption spectra of catechol and the chemical oxidation product and the influence of ascorbic acid and glutathione. A: 2.5×10^{-4} M catechol. B: A + 1.7×10^{-4} M iodine. C: B + 0.25 mg of ascorbic acid. D: B + 0.25 mg of glutathione.
Fig. 4 a. A: catechol. C: catechol + ascorbic acid. D: catechol + glutathione

When catechol was oxidized by iodine the maximum absorption of catechol at 275 mμ disappeared rapidly with the simultaneous development of a new maximum at 390 mμ, which is characteristic of the absorption of o-benzoquinone (Fig. 4).

Addition of ascorbic acid or glutathione to the oxidized catechol solution causes a disappearance of the absorption at 390 mμ. This suggests the disappearance of o-benzoquinone in the reaction mixture. Bathochromic shift of the original absorption of catechol when glutathione was added to the o-benzoquinone solution suggests the formation of a new compound (perhaps an addition product).

Figure 4 a shows that absorption maximum of catechol at 275 mμ was not interfered by the presence of glutathione.

7. Influence of ascorbic acid or glutathione to the enzymatic oxidation of polyphenols

Polyphenoloxidase was extracted from the mycelium of *C. miyabeanus* and polyphenols were oxidized by the enzyme (Fig. 5, 6).

Similarly to the case of chemical oxidation, the absorption maximum of chlorogenic acid was decreased by enzymatic oxidation. When ascorbic acid or glutathione was added, 10 minutes after the reaction was initiated, to the reaction mixture containing chlorogenic acid and polyphenoloxidase, optical density at 326 mμ increased a little (Fig. 5). Perhaps this is due to that most of the oxidized product was polymerized and prevents the reversal of the oxidation.

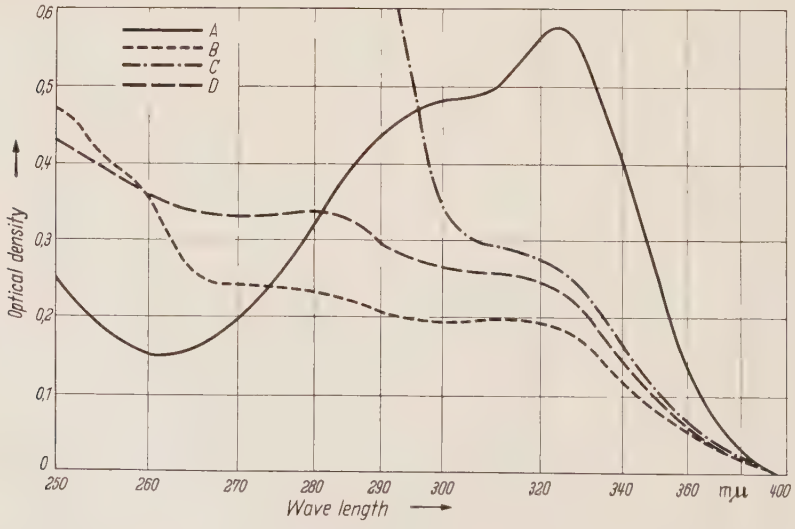

Fig. 5. Absorption spectra of chlorogenic acid and the enzymatic oxidation product and the influence of ascorbic acid and glutathione. A: 3×10^{-5} M chlorogenic acid. B: A + 1 ml of enzyme solution (after 10 min.). C: B + 0.25 mg of ascorbic acid. D: B + 0.25 mg of glutathione

Unlike the chemical oxidation, of catechol oxidation by polyphenoloxidase did not cause the decreased optical density at 275 mμ and the appearance of new maximum at 390 mμ was not sharp. However, the addition of ascorbic acid or glutathione to the reaction mixture before the oxidation initiated resulted in no increased optical density at 390 mμ. This shows that o-benzoquinone was not present in the solution containing ascorbic acid or glutathione (Fig. 6).

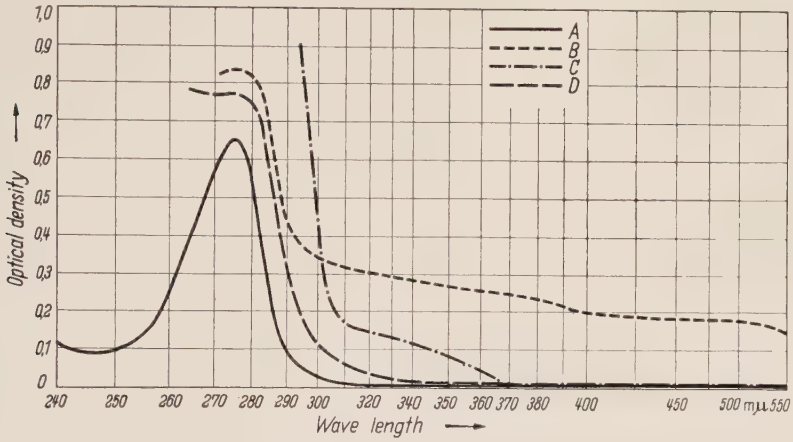

Fig. 6. Absorption spectra of catechol and the enzymatic oxidation product and the influence of ascorbic acid and glutathione. A: 2.5×10^{-4} M catechol. B: A + 1 ml of enzyme solution (after 14 min.). C: 2.5×10^{-4} M catechol + 0.25 mg of ascorbic acid + enzyme solu. (after 14 min.). D: 2.5×10^{-4} M catechol + 0.25 mg of glutathione + enzyme solu. (after 14 min.)

8. Stability of chlorogenic acid and polyphenoloxidase

As shown in Figure 5 the quinone form of chlorogenic acid produced by the enzymatic oxidation was very unstable and most of the quinone were polymerized during 10 minutes. In order to determine whether this polymerization is catalyzed by the enzyme preparation, non-enzymatic polymerization was observed at first.

A. Chemical oxidation

Chlorogenic acid placed in several test tubes was oxidized by iodine and ascorbic acid solution was added into each tube respectively at 10 minutes interval for 100 minutes, and the optical density at 326 mμ was recorded (Fig. 7, curve B). On the other hand, once decreased optical density by the iodine oxidation was spontaneously increased gradually. This increased optical density is not a specific absorption but it may be a basal absorption owing to the spontaneously polymerization of the quinone. Therefore, the shaded part in Figure 7 shows the presence of the quinone form of chlorogenic acid, and the coincidental point of both curves shows the disappearance of the quinoid in this reaction mixture. Thus all the quinones in the reaction mixture changes into the polymers within about one hour.

B. Oxidation by fungal polyphenoloxidase

Chlorogenic acid placed in several test tubes was oxidized by fungal polyphenoloxidase and ascorbic acid solution was added into each tube respectively at 1 minute interval and the recoveries of optical density at 326 mμ were observed (Fig. 8).

The arrows show the addition of ascorbic acid and the recovery of optical densities. Thus the chlorogenic acid oxidized by the enzyme solution was polymerized rapidly and almost all the quinone had disappeared within a quarter of an hour.

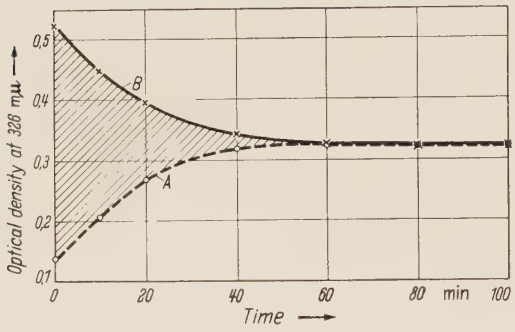

Fig. 7. Stability of quinone form of chlorogenic acid oxidized by iodine. A: Spontaneous increase in optical density of oxidized chlorogenic acid. B: Recovery of optical density by the addition of ascorbic acid

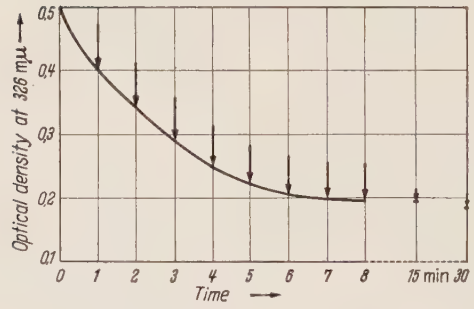

Fig. 8. Reversal of enzymatic oxidation of chlorogenic acid by ascorbic acid. Curve: Decrease in optical density of chlorogenic acid by oxidation. Arrow marks: Recovery of the optical density by the addition of ascorbic acid at each time

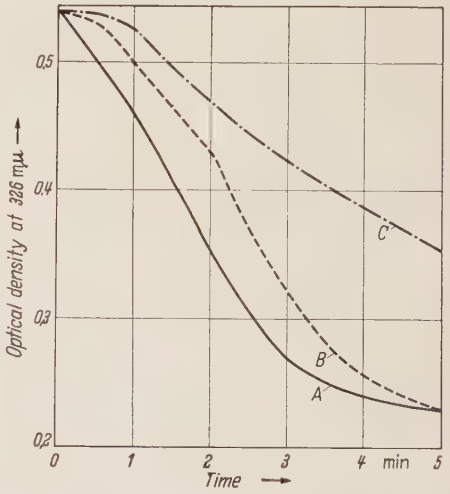

Fig. 9. Influence of ascorbic acid on the enzymatic oxidation of chlorogenic acid. A: 3×10^{-5} M chlorogenic acid + 1 ml of enzyme solution. B: 3×10^{-5} M chlorogenic acid + 3×10^{-5} M ascorbic acid + enzyme solu. C: 3×10^{-5} M chlorogenic acid + 3×10^{-4} ascorbic acid + enzyme solu

When ascorbic acid was added into the reaction mixture before the oxidation initiated, the optical density at 326 mμ also decreased (Fig. 9). This suggests that since the irreversible second reaction, polymerization, happens very rapidly, the reduction of the oxidation product is not complete even in the presence of ascorbic acid. From the results given in Figures 7, 8 and 9, the enzyme solution of this fungus may catalize the irreversible reaction, polymerization.

DISCUSSION

As reported previously (11), the growth of *C. miyabeanus* was inhibited by various polyphenols containing o-diphenols in their structures. However, because of the high polyphenoloxidase activity of this fungus, it is not clear which the toxic substance is, "phenols" or "the oxidized products", against this fungus. To make the mechanism of disease resistance clear, it is necessary to know both toxicities of phenol and the oxidized product, under the assumption that the resistance against leaf blight disease of rice plant is concerned with the polyphenols of host plant.

If the oxidized products of polyphenol are toxic, obstruction of quinone formation by the inhibitors of polyphenoloxidase, or reduction of quinones to phenols by an adequate reducing agent must result in the elimination of toxicity.

From the results of such experiment, it was demonstrated that the oxidation products, especially quinone, are more toxic than phenol. Rich and Horsfall (12) mentioned that the polymerized products of o-quinones are not more toxic, but in *C. miyabeanus* the brown substance (melanine like substance) derived from catechol oxidation was still toxic.

It seems, therefore, that the symptom of leaf blight disease in which the spotted area does not expand without limitation (8) is due to the inhibition of the growth of pathogenic fungus by the accumulated melanine like substances in the necrotic area.

Furthermore, as the reducing agents which were employed in this experiments, ascorbic acid and glutathione are the naturally occuring substances in plant tissues, it is not unreasonable to suppose that these reducing agents are also associated with the disease resistance. Therefore, detailed studies on the influences of these reducing agents against the polyphenol-polyphenoloxidase system were carried out spectrophotometrically.

As reported by Scent-Györgyi and Vietorisz (14), Uritani and Iechika (17), ascorbid acid reduced the quinones to phenols completely in the present experiments, but glutathione seems to form in addition products with quinones, simultaneous reduction of quinones.

Scent-Györgyi et al. (14) also described that the quinones are reduced by ascorbic acid to phenols before the secondary irreversible reaction occures. However, from the results of this experiments, it was found that the velocity of the second irreversible reaction is so fast in the system of chlorogenic acid-polyphenoloxidase of *C. miyabeanus* that the decrease of chlorogenic acid occured even in the presence of ascorbic acid.

The quinone form of chlorogenic acid itself is very unstable and in the water solution most of quinone polymerize within 1 hour, and moreover, the polyphenoloxidase preparation of *C. miyabeanus* was found to be catalizing this polymerization and making the reaction more rapid.

It seems that the characteristic of the symptom of leaf blight disease, formation of clear brown spot, is depending on the catalytic action of quinone polymerization of causal fungus.

Summary

1. The toxicity of catechol against the mycelium of *Cochliobolus miyabeanus*, pathogenic fungus of leaf blight disease of rice plant, was diminished by the addition of Na-diethyldithiocarbamate, inhibitor of Cu-enzymes, in the culture medium. The toxicity against spore germination was diminished by the addition of biological reducing agents, such as ascorbic acid or glutathione.

2. The brown substance, which is derived form the oxidation of catechol by the polyphenoloxidase of *C. miyabeanus*, is also toxic to this fungus.

3. The toxicity of catechol against spore germination did not increase apparently in parallel with increase in its concentration, and the oxygen uptake of polyphenoloxidase did not increase by increasing of substrate concentration above a certain extent.

4. The oxidation of polyphenols by living conidia as well as enzyme preparation of the mycelium, and the influence of the reducing agents such as ascorbic acid or glutathione were compared with the chemical oxidation of polyphenols by spectrophotometrical methods.

5. The quinone form of chlorogenic acid is very unstable in water solution and all the quinone changes into the polymers within about 1 hour. The enzyme preparation of this fungus catalizes this polymerization.

6. From these experimental results it is concluded that the fungicidal action of polyphenols to *Cochliobolus miyabeanus* depends on the oxidation product by polyphenoloxidase of this fungus. In other words: *Cochliobolus miyabeanus* causes "self inhibition" in the polyphenol solution.

7. The relations between the natures of polyphenoloxidase of *Cochliobulus miyabeanus* and the characteristics of the leaf blight disease (Helminthosporiosis) of rice plant were discussed.

Acknowledgment

The author wishes to thank Prof. S. Akai, Kyoto University, Mr. M. Matsui, director of our laboratory, Mr. Y. Miura, of our laboratory, for their helpful advices and encouragements.

Zusammenfassung

1. Die toxische Wirkung des Brenzkatechins gegenüber *Cochliobolus miyabeanus* wird durch Zusatz von Diäthyldithiocarbamat, als Inhibitor für Cu-haltige Enzyme, verringert. Die keimungshemmende Wirkung des Brenzkatechins auf die Sporen des Pilzes kann durch Zusatz von biologischen Reduktionsmitteln wie Ascorbinsäure und Glutathion aufgehoben werden.

2. Der braunen melaninähnlichen Substanz, die bei der Oxydation des Brenzkatechins durch die aus *Cochliobolus miyabeanus*-Myzelien gewonnenen Polyphenoloxidasepräparate entsteht, kommt ebenfalls eine erhebliche Giftwirkung gegenüber dem Pilz zu.

3. Die Hemmwirkung des Brenzkatechins scheint sich nicht parallel zur Konzentrationserhöhung zu verstärken, während mit steigender Substratkonzentration die oxydative Wirkung der Polyphenoloxydase beschleunigt wird.

4. Die Oxydationsprodukte von Phenolen, die durch die Wirkung lebender Konidien und aus Myzelien gewonnener Enzympräparate des Pilzes wie auch durch die Einwirkung von Reduktionsmitteln (Ascorbinsäure und Glutathion) entstehen, wurden spektrophotometrisch untersucht und in Parallele gesetzt zu rein chemisch oxydierten Phenolen.

5. Die Polimerisation des der Chlorogensäure entsprechenden Chinons in wäßriger Lösung wird durch das aus Pilzmyzel hergestellte Enzympräparat beschleunigt.

6. Aus diesen Versuchsergebnissen geht hervor, daß die Hemmwirkung von Phenolen gegenüber *Cochliobolus miyabeanus* zur Hauptsache auf die unter der Wirkung der Polyphenoloxydase des Pilzes entstehenden Oxydationsprodukte zurückzuführen ist. Der Pilz „vergiftet" sich selbst.

7. Die Zusammenhänge zwischen der Wirkung der Polyphenoloxydase von *Cochliobolus miyabeanus* und den Symptomen der Helminthosporiose von Reispflanzen werden diskutiert.

Literature cited

1. Farkas, G. L., and Z. Király, 1958: Enzymological aspects of plant diseases. I. Oxidative enzymes. Phytopath. Z. **31**, 251—272.

2. Freudenberg, K., 1920: Über Gerbstoffe. III. Chlorogensäure, der gerbstoffartige Bestandteil der Kaffeebohnen. Ber. **53**, 232—239.

3. Johnson, G., and L. A. Schaal, 1952: Relation of chlorogenic acid to scab resistance in potatoes. Science **115**, 627—629.

4. Király, Z., 1959: On the role of phenoloxidase activity in the hypersensitive reaction of wheat varieties infected with stem rust. Phytopath. Z. **35**, 23—26.

5. — —, and G. L. Farkas, 1959: Biochemical trends in plant pathology. Phytopath. Z. **34**, 341—364.

6. Kuč, J., 1957: A biochemical study of the resistance of potato tuber tissue to attacks by various fungi. Phytopathology **47**, 676—680.

7. — —, R. E. Henza, A. J. Ullstrup and F. W. Quackenbush, 1956: Chlorogenic acid and caffeic acids als fungistatic agents produced by potatoes in response to inoculation with *Helminthosporium carbonum*. J. Am. Chem. Soc. **78**, 3123—3125.

8. Kurosaki, Y., 1957: Über die Beziehung zwischen der Fleckengrößeverteilung und der Widerstandsfähigkeit von Reispflanzen bei der Helminthosporiose. Ann. Phytopath. Soc. Japan **22**, 251—256.

9. Lee, S., and D. Tourneau, 1958: Chlorogenic acid content and *Verticillium* wilt resistance of potatoes. Phytopathology **48**, 268—273.

10. Link, K. P., and J. C. Walker, 1933: The isolation of catechol from pigmented onion scales and its significance in relation to disease resistance in onions. J. Biol. Chem. **100**, 379—383.

11. Oku, H., 1958: Biochemical studies on *Cochliobolus miyabeanus*. III. Some oxidizing enzymes of the rice plant and its parasites and their contribution of the lesions. Ann. Phytopath. Soc. Japan **23**, 169—175.

12. Rich, S., and J. G. Horsfall, 1954: Relation of polyphenol oxidases to fungitoxicity. Proc. Nat. Acad. Science **40**, 139—145.

13. Schaal, L. A., and G. Johnson, 1958: The inhibitory effect of phenolic compounds on the growth of *Streptomyces scabies* as related to the mechanism of scab resistance. Phytopathology **45**, 626—628.

14. Scent-Györgyi, A., und K. Vietorisz, 1931: Bemerkungen über die Funktion und Bedeutung der Polyphenoloxydase der Kartoffeln. Biochem. Z. **233**, 236—239.

15. Sisler, E. C., and H. E. Evans, 1958: Direct spectrophotometric determination of chlorogenic acid oxidase activity. Biochem. Biophys. Acta **28**, 638—639.

16. Uritani, I., and T. Akazawa, 1955: Antibiotic effect on *Ceratostomella fimbriata* of ipome-amarone, an abnormal metabolite in black rot of sweet potato. Science **121**, 216—217.

17. — —, and K. Iechika, 1953: Phytopathological chemistry of black-rotten sweet potato. Part 9. Some knowledges concerning ascorbic acid in the rotten sweet potato. J. Agr. Chem. Soc. Japan **27**, 688—692.

18. Vörös, J., Z. Király and G. L. Farkas, 1957: Role of polyphenolase in streptomycin-induced resistance to *Phytophthora* in potato. Science **126**, 1178.

19. Wakimoto, S., and H. Yoshii, 1958: Relation between polyphenols contained in plants and phytopathogenic fungi. (I). Polyphenols contained in rice plants. Ann. Phytopath. Soc. Japan **23**, 79—84.

Aus der Eidgenössischen Versuchsanstalt für Obst-, Wein- und Gartenbau, Wädenswil

Direktor: Prof. Dr. F. Kobel

Untersuchungen über die Morphologie und Biologie von *Tranzschelia pruni spinosae* (Pers.) Dietel und *T. discolor* (Fuck.) Tranz. et Litv.

Von

S. Blumer

Mit 9 Abbildungen

Auf kultivierten Steinobstarten, besonders auf Pfirsich, Mandel, Aprikosen, Zwetschgen und Pflaumen ist der Rost in den Anbaugebieten aller Erdteile verbreitet und richtet mitunter beträchtlichen Schaden an. In der Schweiz befällt er in erster Linie Zwetschgen- und Pflaumenbäume sowie die Aprikosen, während er auf dem Pfirsich selten stark schädigend auftritt. Abbildung 1 zeigt die Auswirkungen eines starken Rostbefalls an einer anfälligen Zwetschgensorte. Am 9. September standen die unbehandelten Bäume schon fast kahl da, während die mit Zineb behandelten Bäume der gleichen Sorte keinen Blattfall aufwiesen. Wo der Pfirsich in großem Maßstabe

Abb. 1. Links: Mit Zineb behandelter Baum der Zwetschgensorte Ruth Gerstetter. Rechts: Unbehandelter Baum der gleichen Sorte. Aufnahmen vom 8. September 1953

angebaut wird, wie z. B. in Italien, Kalifornien und Neuseeland, verursacht der Rost hauptsächlich durch vorzeitigen Blattfall auch auf dieser Nährpflanze bedeutenden Schaden. Von den bei uns wildwachsenden *Prunus*-Arten wird nur *Prunus spinosa* befallen.

E. GÄUMANN (1959) unterscheidet in seiner Monographie der mitteleuropäischen Rostpilze vier morphologisch-biologische Formen der *Tranzschelia pruni spinosae*:

1. f. sp. *typica* (*T. pruni spinosae typica* Dunegan),
2. f. sp. *discolor Jacky* (*T. pruni spinosae discolor* Dunegan),
3. *T. Arthurii* Tranz. et Litv. in Nordamerika,
4. *T. microcerasi* Tranz. et Litv. in Zentralasien.

Er erwähnt aber, daß die Wirtswahl und die systematische Gliederung der *T. pruni spinosae* noch ungenügend geklärt sei, da sich die Beobachtungen der Alten und der Neuen Welt teilweise widersprechen.

Auch TRANZSCHEL und LITVINOV (1939) weisen darauf hin, daß die amerikanischen und die europäischen Formen des Pilzes nicht mit Sicherheit identifiziert werden können. Sie schlagen daher vor, die *Tranzschelia pruni spinosae* nach ihrer Verbreitung in drei Formen aufzuteilen: *f. europaea, f. americana* und *f. asiatica*. Da hier die geographische Verbreitung das einzige Kriterium darstellt, handelt es sich um eine Notlösung, die auf die Dauer nicht befriedigen kann.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich ausschließlich mit den in Europa vorkommenden Formen *T. pruni spinosae (typica)* und *T. discolor*.

I. MORPHOLOGISCHE UNTERSUCHUNG

1. Unterscheidungsmerkmale der beiden Arten

FUCKEL (1869) erwähnt in seinen „Beiträgen zur Kenntnis der rheinischen Pilze" auf Seite 49 *Puccinia prunorum* Lk. auf *Prunus domestica* und *P. spinosa*. Nach seiner Abbildung handelt es sich dabei eindeutig um die von PERSOON beschriebene *Puccinia pruni spinosae*. In einem Exsikkat aus dem Herbarium FUCKEL (Nr. 1583 von Oestrich, Nassau auf *Prunus spinosa* und *P. insititia*) ist tatsächlich nur die typische Form der *T. pruni spinosae* enthalten.

Auf Seite 50 gibt FUCKEL seiner neuen Art *Puccinia discolor* folgende Beschreibung: „Die Teleutosporen unterscheiden sich von denen der *Puccinia prunorum* durch die etwas geringere Größe (34 Mik. lang) und besonders dadurch, daß das untere Fach immer kleiner, in der Regel länglich und heller gefärbt ist, auch ist die ganze Spore, besonders das untere Fach bei weitem kürzer stachelig als bei *P. prunorum*". FUCKEL fand diesen Pilz auf *Prunus insititia* und bezeichnet ihn als selten. Nach der Beschreibung und nach seiner Abbildung kann es sich nur um die Form handeln, die wir heute als *Tranzschelia discolor* (Fuck.) Tranz. et Litv. bezeichnen.

Jacky (vgl. Aderhold 1901) machte 32 Jahre später erneut auf das Vorkommen der beiden Formen des Rostes aufmerksam, wobei er ausdrücklich erwähnt, daß sein Typus II der Fuckelschen *Puccinia discolor* entspreche. Er erwähnt, daß die beiden „Typen" nicht in allen Fällen streng geschieden seien und läßt die Frage offen, ob es sich um zwei verschiedene Arten handle oder ob die morphologischen Unterschiede durch Wirtseinfluß oder durch klimatische Faktoren bedingt seien.

Arthur (1906 b, c) stellte *Puccinia pruni spinosae* in seine neue Gattung *Tranzschelia*. Diese unterscheidet sich von *Puccinia* im Bau der Spermogonien, in der Ausbildung der Uredosporen und vor allem durch die stark warzigen Teleutosporen, deren Stiele gebündelt (verklebt) sind. Nach Arthur ist *Tranzschelia* in die Nähe von *Ravenelia* zu stellen. Ein weiteres wichtiges Merkmal der Gattung *Tranzschelia* besteht nach Dietel darin, daß die beiden, leicht auseinanderfallenden Einzelzellen der Teleutosporen entwicklungsgeschichtlich einer Sporenkette entsprechen (Gäumann 1959).

Die Frage, ob die beiden Formen des Rostes als verschiedene Arten zu betrachten seien oder ob es sich um phänotypische Variationen (Matrikalmodifikationen) handle, wurde von Cristinzio (1936) wieder aufgegriffen. Er glaubte, daß Fuckel seine *Puccinia discolor* auf Grund einer Untersuchung von unreifem Material aufgestellt habe. Cristinzio hat aber die typische *Tranzschelia pruni spinosae* auf *Prunus spinosa* nicht in seine Untersuchung einbezogen. Die von ihm beschriebenen Formen, die er wohl mit Recht als Matrikalmodifikationen bezeichnet, gehören ausnahmslos zu *Tranzschelia discolor*.

Nach Dunegan (1938) kommt in Amerika *Tranzschelia pruni spinosae typica* ausschließlich auf wildwachsenden *Prunus*-Arten vor, und die Aecidienwirte sind wohl ebenfalls wildwachsende *Anemone-*, *Hepatica-*, *Thalictrum-* und *Ranunculus*-Arten. Dagegen befällt *Tranzschelia pruni spinosae discolor* nach Dunegan nur kultivierte *Prunus*-Arten. Später (1953) bedienen sich Dunegan und Mitarbeiter wieder der binären Nomenklatur, wobei sie mit Recht auf die Arbeit von Tranzschel und Litvinov (1939) zurückgreifen.

Im reifen Zustande sind die beiden Arten auf den ersten Blick zu unterscheiden. Bei *Tranzschelia pruni spinosae* sind die beiden Zellen der Teleutospore in Größe, Form, Skulptur und Farbe nicht voneinander zu unterscheiden. Sie sind lose miteinander verbunden, und die Teleutospore macht deshalb tatsächlich den Eindruck einer Sporenkette.

In Tabelle 1 sind unsere Messungen an Teleutosporen der beiden Arten zusammengestellt. Von jeder Art wurden 500 Sporen gemessen, d. h. es wurden je 50 Messungen an Material von 10 Proben verschiedener Herkunft durchgeführt. Bei *Tranzschelia pruni spinosae* stammten 7 Proben von *Prunus spinosa* und 3 von *Prunus domestica*, Sorte Fellenberg (aus Infektionsversuchen). Die Proben von *Tranzschelia discolor* stammten von verschiedenen Zwetschgen- und Pflaumensorten.

Es geht aus diesen Messungen hervor, daß sich *Tranzschelia discolor* durch die schlankere Basalzelle von *T. pruni spinosae* unterscheidet. Bei *T.*

Tabelle 1
Messungen an Teleutosporen

	T. pruni spinosae		*T. discolor*	
	Mittelwert	häufigste Werte	Mittelwert	häufigste Werte
	μ	μ	μ	μ
Obere Zelle				
Länge	18,5	16 — 20	17,5	15 — 20
Breite	20,2	18 — 22	19,5	17 — 21
Untere Zelle				
Länge	17,7	16 — 20	17,0	14 — 20
Breite	19,1	18 — 21	15,2	12 — 17

discolor zeigt die untere Zelle bedeutende Unterschiede in der Form, oft ist sie nach unten verschmälert oder auch fast kubisch. Nicht selten erinnert die Teleutospore an einen Steinpilz, wobei die Basalzelle den Stiel darstellt. Bei *T. pruni spinosae* sind die beiden Zellen immer von gleicher Größe und meistens etwas breiter als lang.

Die Wand beider Zellen ist bei *T. pruni spinosae* überall ungefähr gleich dick. Bei *T. discolor* ist die Wand der oberen Zelle am Scheitel meistens etwas verdickt, während die untere Zelle nur an den Seitenwänden eine leichte Wandverdickung aufweist (Abb. 2).

Tranzschelia pruni spinosae zeigt an beiden Zellen eine sehr starke und dichte Bestachelung. Bei *T. discolor* ist die apikale Zelle weniger skulptiert, und bei der basalen Zelle fehlen die Stacheln überhaupt oder sie sind nur als kleine, in Längsreihen stehende Warzen angedeutet.

Bei *Tranzschelia pruni spinosae* sind beide Zellen der reifen Teleutospore dunkelbraun gefärbt. Bei *T. discolor* zeigt nur die obere Zelle diese Färbung,

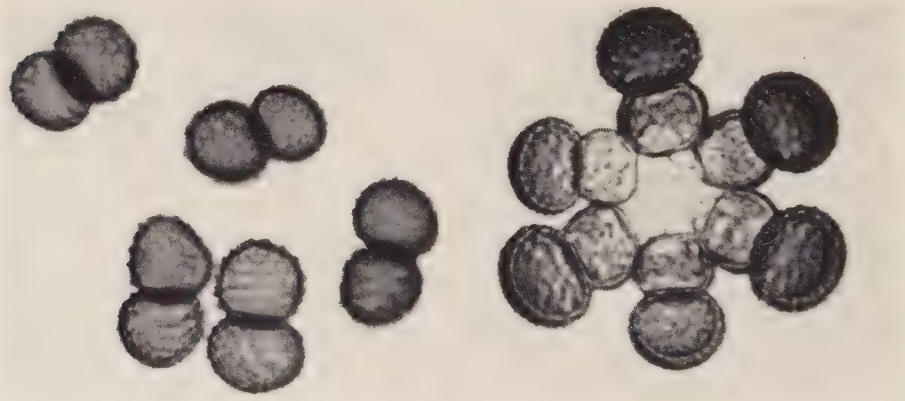

Abb. 2. Teleutosporen von *Tranzschelia pruni spinosae* (links) und *T. discolor* (rechts), beide auf *Prunus spinosa* (Infektionsversuche). Vergr. etwa 640×

die untere kann fast farblos oder mehr oder weniger braun sein. In der Regel ist sie aber immer heller gefärbt als die obere Zelle. Die schwächere Färbung der Basalzelle ist wohl ein auffälliges, aber nicht sehr konstantes Merkmal der *Tranzschelia discolor.*

Berücksichtigt man nur die reife Teleutospore, so erscheinen die Unterschiede so klar, daß man den jahrzehntelangen Streit um die taxonomische Bedeutung dieser Merkmale kaum verstehen kann. Bei jungen Teleutosporen sind jedoch die Unterschiede zwischen den beiden Arten nicht so deutlich. Die terminale Zelle der Spore entwickelt und differenziert sich bedeutend rascher als die basale Zelle. Dies gilt für beide Arten. Bei jungen Teleutosporen der *Tranzschelia pruni spinosae* ist die untere Zelle noch hyalin oder höchstens schwach bräunlich gefärbt, wenn die obere schon dunkelbraun ist. Desgleichen entwickelt sich auch die Skulptur der oberen Zelle bedeutend rascher. Wenn an der oberen Zelle die Stacheln schon fertig ausgebildet sind, so sieht man an der unteren erst wenig differenzierte Warzen. Auch das Wachstum der unteren Zelle ist verzögert. In diesen Stadien der Sporenbildung zeigt also auch *Tranzschelia pruni spinosae* die für *T. discolor* charakteristischen Eigenschaften, und es ist deshalb begreiflich, daß Cristinzio (1936) die *T. discolor* nur als eine unreife Form der *T. pruni spinosae* betrachtete. Er wurde auch durch die bedeutenden Variationen der *T. discolor* auf verschiedenen Wirten in dieser Auffassung bestärkt. Ich muß gestehen, daß ich jahrelang den Standpunkt von Cristinzio teilte. Erst als die Durcharbeitung des aus den Infektionsversuchen erhaltenen Materials zeigte, daß eine *Tranzschelia pruni spinosae* von *Anemone ranunculoides* auf allen Wirten wieder die Teleutosporen dieser Art bildete und anderseits aus Aecidiosporen auf *Anemone coronaria* immer wieder nur *T. discolor* entstand, kam ich zur Überzeugung, daß es sich um zwei verschiedene Arten handeln muß. *Tranzschelia pruni spinosae* auf dem Hauptwirt *Prunus spinosa* kann als Ausgangsform betrachtet werden, während *T. discolor* eine rückgebildete oder in der Entwicklung stehengebliebene Form darstellt.

Für diese Auffassung spricht auch die Ausbildung der Sporenstiele. Schon Arthur (1906) hatte auf die gebündelten (offenbar miteinander verklebten) Stiele der Teleutosporen bei *Tranzschelia* aufmerksam gemacht. Er sah in diesem Merkmal eine Beziehung zur Gattung *Ravenelia.* Die Stiele der Teleutosporen sind tatsächlich bei beiden *Tranzschelia*-Arten verklebt, so daß die jungen Sporen in Ballen zusammenbleiben. Bei *T. pruni spinosae* lösen sich aber diese Bündel der Stiele vor der Sporenreife auf, und die Teleutosporen werden einzeln frei. Das hat zur Folge, daß die Teleutosporenlager dieser Art früh auseinanderfallen und bei der Reife staubig werden. *Tranzschelia discolor* bleibt auch in dieser Beziehung im Jugendzustande stecken. Hier sind die Sporenballen, in denen 5 bis 20 Teleutosporen durch die verklebten Stiele zusammengehalten werden, noch in späteren Reifestadien sichtbar (Abb. 2 rechts). Oft werden die Sporen nicht einzeln frei, sondern das Lager zerfällt in einzelne Ballen, die in der Umgebung mit bloßem Auge sichtbar sind und die von Blattläusen und Spinnmilben über die ganze Oberfläche des Blattes verfrachtet werden. Sehr häufig bleiben die Lager der

T. discolor lange geschlossen und krustig. Diese Art ist also auch in der Entwicklung der Stiele auf einem Jugendzustand stehengeblieben.

2. Die Verbreitung der beiden Arten auf verschiedenen Wirtspflanzen

Um die Verbreitung der beiden Rostarten auf den verschiedenen Wirten näher kennenzulernen, wurde Herbarmaterial aus den Sammlungen der Eidg. Technischen Hochschule in Zürich sowie aus den Herbarien der Universitäten Bern und Zürich untersucht. Den Herren Prof. E. GÄUMANN und Dr. E. MÜLLER, Zürich, Prof. M. WELTEN, Bern und Prof. E. SCHMID, Zürich danken wir für die Überlassung dieser Materialien bestens. Außerdem wurden zahlreiche Proben frisch gesammelten Materials untersucht.

Wir beschränkten uns dabei auf die Untersuchung der Teleutosporen, wobei die Variabilität der beiden Arten im Vordergrund stand.

Tranzschelia pruni spinosae kommt bei uns hauptsächlich auf *Prunus spinosa* vor (Tab. 2). Auf dieser Pflanze scheint unter natürlichen Bedingungen *T. discolor* überhaupt nicht vorzukommen. Wie aber unsere Infektionsversuche zeigten, ist *Prunus spinosa* kein Differentialwirt für *Tranzschelia pruni spinosae*. Unter den Bedingungen unserer Versuche ging auch *T. discolor* auf diesen Wirt über (Abb. 2). Nach den Untersuchungen von DUNEGAN (1938) kommt *Tranzschelia pruni spinosae (typica)* in Amerika nur auf wildwachsenden *Prunus*-Arten vor. Diese Regel kann für das natürliche Vorkommen in Europa nicht gelten, da *T. pruni spinosae* bei uns auch auf Zwetschgen, Aprikosen und Myrobalanen nicht selten auftritt.

Tabelle 2

Häufigkeit der beiden Arten auf verschiedenen Wirtspflanzen

Prunus-Art	*T. pruni spinosae*	T. discolor (a)*	T. discolor (b)*
P. domestica L. (einschl. *P. insititia* L.) ..	38	86	77
P. Armeniaca L.	5	4	6
P. Persica (L.) Stokes	—	4	3
P. cerasifera Ehrh. (*P. myrobalana* Lois.)	1	2	4
P. cerasifera Ehrh. var. *atropurpurea* Jäger (= *P. Pissardii* Carr.)	2	—	—
P. Amygdalus Batsch.	—	—	1
P. spinosa L.	48	—	—
P. Mahaleb L.	—	2	2
P. Chicasa Michx. (= *P. angustifolia* Marsh.)	1	—	—
P. pumila L.	1	—	—
P. serotina Ehrh.	1	—	—
P. Nakaii (Lév.) Rehd.	1	—	—

* Anmerkung: Unter *T. discolor* sind in Kolonne (a) die Fälle aufgeführt, bei denen über die Zugehörigkeit zu dieser Art kein Zweifel bestehen kann, unter (b) die Fälle, bei denen die Differenzierung der Basalzelle teilweise etwas weiter fortgeschritten ist (Zwischenform).

Die morphologischen Eigenschaften der Teleutosporen der *Tranzschelia pruni spinosae* zeigen im Gegensatz zu *T. discolor* keine auffälligen Variationen auf den verschiedenen Wirtspflanzen. Die beiden Zellen der reifen Spore sind immer in Form, Größe, Skulptur und Farbe gleich.

Bei *Tranzschelia discolor* treten dagegen die morphologischen Variationen bedeutend stärker in den Vordergrund. Die Differenzierung der Basalzelle, die für diese Art das wichtigste Merkmal bildet, kann offenbar durch äußere Einflüsse und vor allem auch durch den Wirt in verschiedenem Maße gehemmt werden. Wir betrachten eine Form nur dann als *T. pruni spinosae*, wenn die Basalzelle der reifen Spore überhaupt keine Hemmungen in der Differenzierung aufweist, wenn also beide Zellen morphologisch vollständig übereinstimmen. Wo an der Basalzelle irgendeine Hemmung in der Entwicklung sichtbar wird, handelt es sich nach unserer Auffassung schon um *T. discolor*. Der Grad der Hemmung kann verschieden sein. Sie kann sich in allen Merkmalen, z. B. in der Größe, Form, Membranskulptur und in der Farbe der Basalzelle geltend machen. In diesen Fällen (Kolonne a in Tab. 2) bereitet die Einordnung des Pilzes keine Schwierigkeiten. Es sind hier aber naturgemäß zahlreiche Abstufungen möglich. Da diese in unseren Infektionsversuchen nur auftraten, wenn Aecidiosporen von *Anemone coronaria* und *A. fulgens* verwendet wurden, müssen wir diese Zwischenformen als Modifikationen der *Tranzschelia discolor* betrachten (Kolonne b).

Auf Zwetschgen, Pflaumen und Myrobalanen ist in der Schweiz und wohl in ganz Europa *Tranzschelia discolor* bedeutend häufiger als *T. pruni spinosae*. Auf dem Pfirsich werden bei uns nur selten Teleutosporen gebildet. Auf dieser Nährpflanze, wie auch auf *Prunus Mahaleb* habe ich ausschließlich *Tranzschelia discolor* gefunden, obschon beide Pflanzen nach unseren Infektionsversuchen auch von *T. pruni spinosae* befallen werden können (vgl. S. 368).

II. BIOLOGIE

Tranzschel (1903 und 1905) stellte auf Grund theoretischer Überlegungen fest, daß das *Aecidium punctatum* Pers. auf *Anemone ranunculoides* und *A. coronaria* in den Entwicklungskreis der *Puccinia (Tranzschelia) pruni spinosae* gehört. Mit Aecidiosporen auf *Anemone ranunculoides* konnte er *Prunus spinosa* infizieren, und von *Anemone coronaria* ging der Pilz auf *Prunus Amygdalus, P. spinosa* und *P. divaricata* über. Diese Ergebnisse wurden von Krieg (1907) bestätigt und erweitert.

Nach Arthur (1906 a) geht eine amerikanische Form von *Hepatica acutiloba* auf *Prunus serotina*, aber nicht auf *P. americana, P. Cerasus* und *P. Persica* über. Arthur schloß daraus, daß die amerikanischen Formen der *Tranzschelia pruni spinosae* nicht ohne weiteres mit den europäischen identifiziert werden dürfen. Weitere Versuche amerikanischer Autoren zeigten übereinstimmend einen geringen Grad der Spezialisation in der Dikaryophase auf Steinobst.

Als Aecidienwirte kommen in Nordamerika außer der als Zierpflanze angebauten *Anemone coronaria* noch zahlreiche andere Ranunculaceen aus den Gattungen *Hepatica, Thalictrum* und *Ranunculus* vor. Bis jetzt scheinen keine systematischen Infektionsversuche mit diesen Aecidien durchgeführt worden zu sein, so daß eine Identifikation der amerikanischen und europäischen Formen noch nicht möglich ist.

Nachdem unsere morphologische Untersuchung ergeben hat, daß die Unterscheidung von zwei morphologischen Arten gerechtfertigt ist, liegt es nahe, auch die Ergebnisse der Infektionsversuche für beide Arten getrennt darzustellen.

1. Infektionsversuche

In den Jahren 1951 bis 1959 wurden Infektionsversuche mit Aecidio-, Uredo- und Teleutosporen durchgeführt. Für die Versuche mit Aecidio- und Uredosporen benutzten wir jeweilen 5 zwei- bis dreijährige Sämlinge der verschiedenen Steinobstarten. Die Pflanzen wurden nach der Infektion 24 Stunden feucht gehalten und blieben dann bis zum Herbst im Gewächshaus. In den Freilandversuchen wurden die infizierten Zweige 2 Wochen in Polyäthylenbeuteln gehalten.

a) *Tranzschelia pruni spinosae*

Der Aecidienwirt dieser Art, *Anemone ranunculoides*, ist in der Schweiz ziemlich weit verbreitet, doch kommt diese gelb blühende Art nirgends so massenhaft vor wie ihre weiß blühende Schwester, *Anemone nemorosa*. ED. FISCHER (1904) gibt für die Schweiz 7 Standorte des *Aecidium punctatum* an, davon 4 in der Westschweiz. In den Herbarien der Universitäten Bern und Zürich sowie der Eidg. Technischen Hochschule ist immerhin Material von ungefähr 50 Standorten vorhanden. Wo der Pilz einmal Fuß gefaßt hat, erhält er sich durch das perennierende Myzel in den Rhizomen jahrzehntelang. Das Myzel läßt sich in Längsschnitten nach Färbung mit Anilinblau-Milchsäure in den Gefäßen, Siebröhren und den angrenzenden Parenchymzellen leicht nachweisen.

Das Infektionsmaterial für unsere Versuche stammte vom Reppischhof bei Dietikon, wo der Pilz jedes Jahr häufig auftritt. An diesem Standort wurde das *Aecidium* nach ED. FISCHER schon 1882 gefunden; der Pilz hat sich dort also seit 78 Jahren behauptet. Der in der Nähe wachsende Schwarzdorn (*Prunus spinosa*) ist alljährlich infiziert, wobei die Stärke dieser Infektionen mit zunehmender Entfernung von den befallenen Anemonen deutlich abnimmt. Andere *Prunus*-Arten, die für einen Wirtswechsel in Frage kämen, sind auf große Distanz nicht vorhanden. Die Infektionen an *Anemone ranunculoides* sind durch die gelblichen, langgestielten Blätter recht auffällig (Abb. 3). Die parasitische Kastration der Blüten wurde schon von MAGNIN (1890) und MAGNUS (1892) beschrieben.

Die **Aecidiosporen** reifen an diesem Standort gewöhnlich etwa um den 20. April, die Sporulation dauert bis Mitte Mai. Die Keimfähigkeit der Aecidiosporen betrug wie in den Versuchen von JOSIFOVIČ (1953) höchstens 1 bis 5 %. Allerdings war der Infektionserfolg gelegentlich gut, auch wenn

die Sporen in Leitungswasser überhaupt nicht keimten. Die Fruktifikationszeit (bis zur Bildung reifer Uredosporen) betrug im Minimum 14 Tage, im Maximum 26 Tage, in den meisten Fällen lag sie bei 21 Tagen. Josifovič gibt für seine Gewächshausversuche bei 20 bis 26 °C eine Fruktifikationszeit von 9 Tagen an; im Freiland, bei 6 bis 18 °, betrug sie 14 Tage. Auf alle Fälle war sie bedeutend kürzer als in meinen Versuchen.

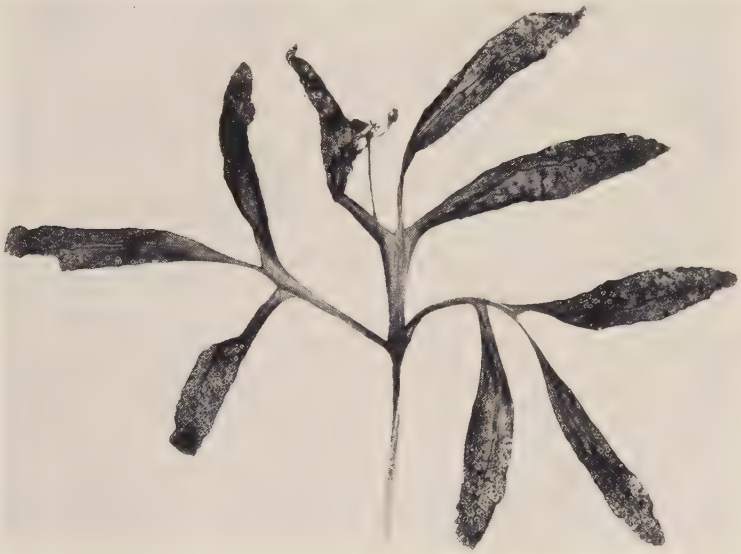

Abb. 3. *Tranzschelia pruni spinosae*, Spermogonien und Aecidien auf *Anemone ranunculoides*

Die Ergebnisse der Übertragungsversuche (6 Wiederholungen) sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Der stärkste Befall wurde auf *Prunus spinosa* beobachtet, also auf der Pflanze, die am natürlichen Standort des Aecidiums allein als Wirt für die Dikaryophase des Pilzes in Betracht kommt (Abb. 9, rechts).

Prunus avium und *P. Padus* wurden in 2 Versuchen nicht von *Tranzschelia pruni spinosae* befallen.

Die Infektionsversuche mit **Uredosporen** zeigten das gleiche Bild. Aus unseren Versuchen mit Aecidiosporen standen von *Prunus spinosa*, *P. Armeniaca* und *P. domestica* Pflanzen zur Verfügung, die genügend Uredosporen für weitere Übertragungsversuche lieferten. In den Gewächshausversuchen wurden alle in Tabelle 3 aufgeführten Arten befallen. Dagegen gelang die Infektion in Freilandversuchen nicht immer, was vermutlich auf ungünstige Bedingungen zurückgeführt werden muß. *Prunus Mahaleb* und *P. cerasifera* wurden in Freilandversuchen überhaupt nie befallen.

Die **Teleutosporen** von *Tranzschelia pruni spinosae* traten in unseren Gewächshausversuchen nicht auf allen Versuchspflanzen gleichzeitig auf. In einem Versuche mit Aecidiosporen enthielten die Lager auf *Prunus domestica* (St. Julien) schon 60 Tage nach der Infektion 42 % Teleutosporen und nach 122 Tagen waren es 95 %. Auf *Prunus domestica* (Fellenberg) und

besonders auf *P. cerasifera* (Myrobalane) setzte die Teleutosporenbildung bedeutend später ein, und auf *P. Persica* und *P. Mahaleb* wurden meistens nur Uredosporen gebildet.

Die Infektionsversuche mit Teleutosporen der *Tranzschelia pruni spinosae* verliefen ohne Ausnahme negativ, so daß hier noch eine wichtige Lücke besteht. Wahrscheinlich bestehen für *Anemone ranunculoides*, die ja als Aecidienwirt sicher in erster Linie in Betracht kommen muß, spezielle Infektionsbedingungen. *Anemone nemorosa* dürfte nach Beobachtungen am Standort für *Tranzschelia pruni spinosae* nicht als Aecidienwirt in Frage kommen. Am Ufer der Reppisch stehen die beiden Anemonen dicht nebeneinander. *Anemone ranunculoides* ist häufig infiziert, während auf *A. nemorosa* dort nur die Mikroform *Tranzschelia fusca* (Relh.) Diet. vorkommt. *Anemone coronaria* und *A. fulgens*, die Aecidienwirte von *Tranzschelia discolor*, wurden von *T. pruni spinosae* in mehrfach wiederholten Versuchen nie befallen. Diese Tatsache weist darauf hin, daß die beiden Rostarten in ihrer Haplophase auf verschiedene *Anemone*-Arten spezialisiert sind.

b) *Tranzschelia discolor*

Aus allen bisherigen Untersuchungen geht hervor, daß als wichtigster Aecidienwirt für den Rost der kultivierten Steinobstarten die im Mittelmeergebiet heimische *Anemone coronaria* in Betracht kommt. Auf dieser Pflanze ist der Pilz z. B. in Palästina weit verbreitet (ZWIRN-HIRSCH, 1946). Dort besteht auch die Möglichkeit, daß er von wildwachsenden Anemonen auf die angebauten Mandeln, Aprikosen, Pfirsiche, Zwetschgen und Kirschen (?) übergehen kann, was in vielen andern Anbaugebieten des Pfirsichs nicht möglich ist, weil dort der Aecidienwirt fehlt.

Abb. 4. *Tranzschelia discolor* auf *Anemone coronaria*. Links gesundes, rechts infiziertes Blatt

Abb. 5. *Tranzschelia discolor,* Aecidien auf *Anemone coronaria*

Anemone coronaria ist eine weit verbreitete Zierpflanze, und es besteht deshalb die Möglichkeit, daß das in den Rhizomen perennierende Myzel durch den Handel verschleppt wird. Gregory (1949) fand das *Aecidium* häufig in Südwest-England, besonders bei zweijähriger Kultur der Anemonen. Bei Rhizomen von *Anemone fulgens* Gay, die von Frankreich nach England importiert wurden, konnte er einen Befall bis zu 50 % feststellen. In Steinobstanlagen, die sich in der Nähe von infizierten Gartenanemonen befinden, ist also der natürliche Wirtswechsel wenigstens theoretisch möglich.

Auf *Anemone coronaria* tritt der Pilz bei uns meistens nur in größeren Betrieben auf, die sich auf die Kultur von Zieranemonen spezialisiert haben. Da infizierte Pflanzen wegen der starken Deformationen an Blättern und Blüten (vgl. Abb. 4 bis 7) unverkäuflich sind, werden sie meistens vernichtet, bevor die Sporulation einsetzt. *Anemone coronaria* spielt deshalb in der Schweiz für die Übertragung des Zwetschgenrostes keine bedeutende Rolle.

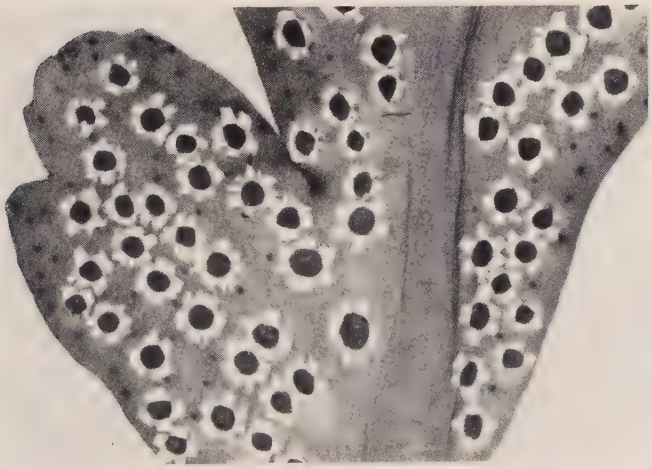

Abb. 6. *Tranzschelia discolor,* Aecidien mit lappig aufreißender Peridie auf *Anemone coronaria*

Das Infektionsmaterial für unsere Versuche mit **Aecidiosporen** stammte in den ersten Jahren aus einer Gärtnerei in Dietikon. Von 1957

an gelang es mir überhaupt nicht mehr, in der Schweiz infizierte Pflanzen aufzutreiben. Die weiteren Versuche wurden deshalb mit Aecidiosporen auf *Anemone fulgens* durchgeführt, die aus einem Infektionsversuch mit Teleutosporen auf Fellenbergsämlingen (*Prunus domestica*) stammten, welche ihrerseits ein Jahr vorher von *Anemone coronaria* aus infiziert worden waren. Der Pilz auf *A. fulgens* ist also sicher identisch mit dem Aecidium auf *A. coronaria*.

Im Jahre 1959 erhielt ich durch Vermittlung der Firma R. Chedanne in Angers befallene Pflanzen (*A. coronaria*) aus Nordfrankreich, und Herr Dr. E. MÜLLER sandte mir infizierte Pflanzen dieser Art von Ste. Maynes b. Antibes, Südfrankreich. Beiden Herren möchte ich auch hier bestens danken.

Die Keimfähigkeit war bei den von *Anemone coronaria* stammenden *Aecidiosporen* bedeutend besser als bei dem von *Anemone ranunculoides* stammenden Material. Sie erreichte hier gelegentlich sogar 100 %.

Abb. 7. *Tranzschelia discolor*. Deformation der Blüten von *Anemone coronaria* (rechts mit Spermogonien)

Die Fruktifikationszeit dieser Form (*T. discolor*) wird für die Aecidiosporen sehr verschieden angegeben. Nach JAFAR (1958) beträgt sie in Neuseeland 8 bis 10 Tage bei 22 °C. ZWIRN-HIRSCH (1946) gibt 51 Tage an, wenn die Versuche im Februar eingeleitet wurden, und 18 Tage, wenn die Infektion im Mai erfolgte. SCOTT und STOUT (1931) geben eine Fruktifikationszeit von 12 bis 20 Tagen an. In meinen Versuchen lag die Fruktifikationszeit zwischen 13 und 38 Tagen, im Durchschnitt betrug sie 22 Tage. Sie ist also bei *Tranzschelia discolor* etwas länger und unregelmäßiger als bei den Aecidiosporen von *T. pruni spinosae* auf *Anemone ranunculoides*. Im Gegensatz zu diesen Angaben stellten französische Autoren (vgl. VIENNOT-BOURGIN [1949] und NICOLAS [1945]) bedeutend längere Fruktifikationszeiten von 39 bis 113 Tagen fest. Es ist anzunehmen, daß es sich dabei teilweise um

Beobachtungen im Freien handelt, bei denen es leicht möglich ist, daß die ersten spärlichen Uredolager übersehen werden.

In Tabelle 3 sind die Ergebnisse unserer Infektionsversuche zusammengestellt. Es handelt sich dabei um 8 Versuche mit *Tranzschelia discolor* und 6 Versuche mit *T. pruni spinosae* (Aecidien auf *Anemone ranunculoides*). Die eingeklammerten Zahlen bezeichnen die Stärke der Infektion innerhalb einer Skala von 1 bis 5. Es bedeuten:

(1) Fleckenbildung und schwache Uredo-Entwicklung,
(2) schwache Uredo- und Teleutosporenbildung,
(3) mittelstarke Infektionen, Uredo- und Teleutosporen,
(4) starke Infektionen,
(5) sehr starke Infektionen.

Tabelle 3

Ergebnisse der Infektionsversuche mit Aecidiosporen im Gewächshaus

Versuchspflanzen	*T. discolor*		*T. pruni spinosae*
	A. coronaria	*A. fulgens*	*A. ranunculoides*
Prunus Persica (L.) Stokes	+ (1)	+ (1)	+ (1)
Prunus Armeniaca L.	+ (2)	+ (2)	+ (3)
Prunus cerasifera Ehrh. var. *Myrobalana* (L.) Lois.	+ (2)	+ (1)	+ (2)
Prunus domestica L.			
Sorte Fellenberg	+ (3)	+ (4)	+ (2)
Sorte Saint Julien	+ (3)	+ (3)	+ (2)
Prunus Mahaleb L.	+ (1)		+ (1)
Prunus spinosa L.	+ (3)		+ (5)

Folgende *Prunus*-Arten wurden von beiden *Tranzschelia*-Arten nicht befallen:

P. avium L. (3 Versuche), *P. Padus* L. (2 Versuche), *P. tomentosa* Thunb. (1 Versuch) und *P. serrulata* Lindl. var. Kwanzan und Shirofugen (1 Versuch).

Diese Infektionsversuche, die sich allerdings auf eine relativ kleine Zahl von *Prunus*-Arten beschränken, zeigen zunächst, daß sich das Wirtsspektrum der *Tranzschelia pruni spinosae* mit Aecidien auf *Anemone ranunculoides* nicht von demjenigen der *T. discolor* mit Aecidien auf *Anemone coronaria* unterscheidet. Damit werden die Angaben von Krieg (1907) bestätigt, der mit Aecidiosporen der *Tranzschelia discolor* auf *Anemone coronaria* auch den Hauptwirt der *Tranzschelia pruni spinosae, Prunus spinosa,* infizieren konnte.

In der Stärke des Befalls zeigten sich auf *Prunus spinosa* deutliche Unterschiede. Diese Art wurde durch *Tranzschelia pruni spinosae* bedeutend stärker befallen als durch *T. discolor. Prunus spinosa* ist für *Tranzschelia pruni spinosae* als Hauptwirt, für *T. discolor* dagegen als Nebenwirt zu be-

zeichnen. Umgekehrt liegen die Verhältnisse bei *Prunus domestica,* doch sind hier die Unterschiede in der Befallsstärke geringer.

Auf *Prunus Persica* konnten wir in den meisten Versuchen nur eine schwache Uredobildung beobachten. Die Infektion beschränkte sich im allgemeinen auf die direkt infizierten Blätter und dehnte sich während der Versuchszeit von rund 4 Monaten nicht weiter aus. In unsern Freilandversuchen mit Aecidio- und Uredosporen von *Tranzschelia discolor* wurde der Pfirsich überhaupt nie befallen. *Prunus Persica* scheint bei uns nur ein ziemlich resistenter Nebenwirt beider Arten des Pilzes zu sein. Zum gleichen Ergebnis kam ED. FISCHER (1925), der beobachtete, daß *Prunus Persica* unmittelbar neben befallener *Anemone coronaria* nur schwache Infektionen zeigte, während die Pflaumenbäume sehr stark befallen waren. Wenn man anderseits die Beschreibungen der amerikanischen Autoren über das Auftreten des Pfirsichrostes in Kalifornien liest, muß man zum Eindruck kommen, daß dort entweder anfälligere Pfirsichsorten angebaut werden oder daß es sich um eine andere biologische Form des Pilzes handelt. Für die letzte Annahme spricht auch die Tatsache, daß SCOTT und STOUT (1931) den Rost auf *Prunus avium* übertragen konnten, während uns dies nicht gelang. Die Angaben über das Vorkommen der *Tranzschelia* auf Kirschen in der Alten Welt dürften möglicherweise auf einer Verwechslung mit *Puccinia cerasi* (Bér.) Cast. beruhen.

Die Myrobalane (*Prunus cerasifera*) wurde in unseren Versuchen stets nur schwach befallen, was mit unsern Beobachtungen im Freiland übereinstimmt. Anderseits beobachtete DELMAS (1952), daß Aprikosen auf Myrobalane als Unterlage besonders rostanfällig seien.

Die **Uredosporen** keimen im allgemeinen besser und regelmäßiger als die Aecidiosporen. GOLDSWORTHY und SMITH (1931) stellten für die Keimungstemperatur folgende Kardinalpunkte fest: Minimum 8 °, Optimum 13 bis 26 °, Maximum 38 °C. CRISTINZIO (1936) erhielt zwischen 8 bis 35 ° Keimungen, das Optimum liegt nach ihm bei 22 bis 25 °. In unsern Versuchen zeigte sich ein deutliches Optimum der Keimungen bei 16 bis 18 °, das Maximum lag bei 30 bis 32 °C.

Im Gewächshaus gelangen die Infektionsversuche mit großer Regelmäßigkeit. Es zeigten sich keine Anzeichen einer Spezialisation innerhalb der fünf verwendeten Steinobstarten *Prunus Persica, P. Armeniaca, P. domestica, P. cerasifera* var. *Myrobalana* und *P. Mahaleb.* Es spielte auch keine Rolle, ob die für die Infektionsversuche verwendeten Uredosporen ursprünglich von Aecidien auf *Anemone ranunculoides* oder auf *A. coronaria* herstammten. In den Freilandversuchen dagegen wurden *P. Persica* und *P. Mahaleb* nie befallen und die Myrobalane nur sehr schwach.

Wie bei den Aecidiosporen ist auch bei den Uredosporen die Fruktifikationszeit von der Temperatur abhängig. Die Schwankungen sind aber nicht so stark wie bei den Versuchen mit Aecidiosporen. In unseren Versuchen betrug die Fruktifikationszeit 16 bis 24 Tage, in den meisten Fällen lag sie zwischen 19 und 21 Tagen. Ähnliche Ergebnisse erzielten CRISTINZIO, DUNEGAN und Mitarbeiter, sowie C. O. SMITH. Dagegen traten in den Ver-

suchen von JAFAR (1958a) schon nach 8 bis 10 Tagen wieder Uredolager auf. Wie bei den Aecidiosporen scheint in Neuseeland auch bei den Uredosporen die Fruktifikationszeit auffallend kurz zu sein. Die Temperatur betrug allerdings 22 °C.

Wir haben früher darauf hingewiesen, daß zwischen den einzelnen Zwetschgensorten große Unterschiede in der Anfälligkeit gegen den Rost bestehen. In den Gewächshausversuchen beschränkten wir uns auf die stark anfälligen Sorten Fellenberg und St. Julien. Am 28. Mai 1952 wurde ein Infektionsversuch im Freiland mit verschiedenen Zwetschgensorten eingeleitet. Die infizierten Äste wurden für 4 Wochen in Polyäthylensäcke eingebunden. Am 25. Juni wurden die Hüllen entfernt und die befallenen Blätter ausgezählt. Die Ergebnisse sind aus Tabelle 4 ersichtlich.

Tabelle 4

Freilandversuch mit verschiedenen Zwetschgensorten

Sorte	infizierte Blätter	befallene Blätter	Befall %	Anfälligkeit der Sorte nach BLUMER (1959)
Ruth Gerstetter	153	49	32	54
Fellenbergzwetschge	280	56	20	41
Ebersweier Frühzwetschge	86	10	11,6	33
Deutsche Hauszwetschge ..	72	0	0	27
Zimmers Frühzwetschge ..	102	5	4,9	17
Bühler Frühzwetschge	98	1	1	13

Mit Ausnahme der Deutschen Hauszwetschge entspricht das Ergebnis dieses Versuches ungefähr der Abstufung in der Anfälligkeit, wie wir sie später (1959) ermittelten.

Bei einer Fruktifikationszeit von 3 Wochen sind von Anfang Mai bis Ende August 5 bis 6 Uredogenerationen möglich, die unter günstigen Infektionsbedingungen für eine allgemeine Verseuchung unserer anfälligen Zwetschgensorten ausreichen.

Um die Ausbreitung des Rostes innerhalb einer Baumkrone zu verfolgen, wurde am 1. Mai 1953 ein Zweig mit 20 Blättern der stark anfälligen Sorte Ruth Gerstetter mit Aecidiosporen von *Anemone coronaria* infiziert und für eine Woche in einen Polyäthylensack eingehüllt. Am 22. Mai, also nach genau 3 Wochen, traten am infizierten Zweige die ersten, noch geschlossenen Uredolager auf. Bis zum 10. Juli waren an den nicht künstlich infizierten Ästen des 5 bis 6 m hohen Baumes noch keine Infektionen sichtbar, doch setzte von dieser Zeit an eine langsam zunehmende Verseuchung des Baumes ein, die deutlich vom infizierten Ast ausging. Am 17. Juli zeigten auch die benachbarten Bäume der gleichen Sorte einzelne Uredolager. Ob diese mit unserer Infektion im Zusammenhang standen oder ob es sich um einen beginnenden Spontanbefall handelte, konnte nicht festgestellt werden. Am 20. August wurde an 8 Stellen an der Peripherie der Krone an je 50 Blättern

in gleicher Höhe wie der künstlich infizierte Zweig der Befallsgrad ermittelt (Skala 0 bis 5). Die gleiche Auszählung wurde etwas weiter oben in etwa 3,5 m Höhe wiederholt. Die Ergebnisse, in Befallsprozenten ausgedrückt, sind aus Tabelle 5 ersichtlich.

Tabelle 5

Ausbreitung der Infektion innerhalb einer Baumkrone
(Auszählung vom 20. August, 112 Tage nach der Infektion)

	W	NW	N	NE	E	SE	S	SW
In 3,5 m Höhe	11,2	20,8	16,8	26,4	21,6	12,0	12,8	10,4
In 2 m Höhe	12,0	14,4	15,2	**61,7***	24,0	18,4	16,8	6,4

*) Künstlich infizierter Zweig.

Der künstlich infizierte Zweig wies noch 112 Tage nach der Infektion weitaus den stärksten Befall auf. Die Infektionshäufigkeit nahm nach beiden Seiten ab bis zum Minimum an dem der Infektionsstelle gegenüberliegenden Ast (SW). Die gleiche Erscheinung zeigte sich in 3,5 m Höhe, wo im NE, also direkt über dem künstlich infizierten Zweig, ebenfalls ein schwaches Maximum festzustellen war. Die Befallszahlen sind aber hier fast überall deutlich niedriger als auf 2 m Höhe. Noch spärlicher werden die Infektionen im obersten Teil der Krone. Es ist anzunehmen, daß im oberen, besser durchlüfteten Teil der Krone die Blätter schneller abtrocknen, womit die Infektionsbedingungen für die Uredosporen ungünstiger werden.

Wenn man den künstlich infizierten Zweig und den direkt über ihm befindlichen nicht berücksichtigt, so zeigte unser Versuchsbaum am 20. August einen durchschnittlichen Befall von 15,2 %, während gleichzeitig bei zwei benachbarten Bäumen der gleichen Sorte ein Befall von 6,7 % bzw. 7,2 % ermittelt wurde. Wir können leider nicht feststellen, wie stark sich unsere künstliche Infektion an den benachbarten Bäumen auswirkte, und andererseits können wir die Spontaninfektionen am Versuchsbaum nicht eliminieren. Immerhin bleibt aber die Tatsache, daß unser Versuchsbaum doppelt so stark befallen war wie die benachbarten Bäume.

Spätere Auszählungen konnten nicht mehr ausgewertet werden, weil der Rostbefall bis Anfang September überall rasch auf über 60 % anstieg, so daß sich die Unterschiede verwischten. Es setzte als Folge der starken Infektion ein vorzeitiger Blattfall ein, der schon um den 8. September zu einer fast vollständigen Entlaubung führte (Abb. 1 rechts).

Es muß hier erwähnt werden, daß im folgenden Jahre (1954) sämtliche Freilandversuche keine einzige Infektion ergaben, obschon das Ausgangsmaterial (Aecidiosporen auf *Anemone coronaria*) eine sehr gute Keimfähigkeit aufwies. Der Rostbefall unserer Zwetschgen- und Pflaumenbäume schwankt von Jahr zu Jahr sehr stark, so daß eine Prognose für die Behandlung vorläufig nicht möglich ist. Bei trockenem Wetter ist der Befall im allgemeinen so schwach, daß kein vorzeitiger Laubfall entsteht. YARWOOD (1951) weist auf die Bedeutung des Taues für die Infektion durch Uredosporen hin.

Im Freiland setzt bei unsern Zwetschgen und Pflaumen die Teleutosporenbildung schon im Juli ein, und gegen Mitte September findet man in den Lagern fast ausschließlich Teleutosporen. Es bestehen also bei uns keine Anhaltspunkte für einen allmählichen Rückgang der Teleutosporenbildung, wie Josifovič (1953) für West- und Nordserbien feststellte. Die Teleutosporenbildung beginnt immer zuerst auf den älteren Blättern, während gleichzeitig auf den jungen Blättern am Ende des Triebes noch ausschließlich Uredosporen vorhanden sind.

Nach Dunegan (1939) keimen die Teleutosporen auf *Prunus serotina* und *P. Persica* im Oktober und November nicht. Wir fanden in einzelnen Proben von Blättern der Ersinger Frühzwetschge schon im Herbst einzelne Keimungen der Teleutosporen und Bildung des Promyzels. Es dürfte sich dabei allerdings um Ausnahmefälle handeln.

Bei Überwinterung der Blätter im Kühlschrank (2 bis 3 °) konnten wir mehrmals im Frühjahr keine Keimung der Teleutosporen feststellen, während Proben des gleichen Materials, das in Gazesäckchen im Freien überwintert wurde, relativ gut keimten. Im allgemeinen war aber die Keimung der Teleutosporen in überwintertem Material unregelmäßig und betrug in keinem Falle mehr als 27 %. Dunegan (1939) erhielt auf Wasseragar eine bessere Keimung als im hängenden Tropfen.

In unseren Infektionsversuchen mit **Teleutosporen** wurden die Pflanzen zuerst zwei Tage feucht gehalten. Sie blieben ungefähr vier Wochen im Gewächshaus und kamen dann ins Freie. Spermogonien und Aecidien erschienen, von seltenen Ausnahmen abgesehen, erst im Frühling des folgenden Jahres. Nach Jafar (1958 a) treten schon wenige Tage nach der Infektion Spermogonien auf. In einem Versuch mit Teleutosporen auf *Prunus spinosa* zeigten einige der infizierten Gartenanemonen nach einem Monat auffällige Blattdeformationen, die an Virus oder an Schäden durch 2,4-D-Präparate erinnerten. Um eine systemische Infektion ohne Sporenbildung konnte es sich dabei nicht handeln, weil die gleichen Pflanzen im folgenden Jahre keine Anzeichen einer Infektion aufwiesen. Man muß wohl annehmen, daß diese Deformationen durch irgendwelche, aus den Teleutosporen herausdiffundierten Substanzen verursacht wurden. Allerdings gelang es uns nicht, diese Veränderungen durch wässerige Extrakte aus Teleutosporen hervorzurufen.

Das Material für unsere Infektionsversuche stammte entweder von *Prunus domestica* und *Prunus spinosa,* die ein Jahr vorher mit Aecidiosporen von *Anemone coronaria* oder von *A. fulgens* aus infiziert worden waren, oder aus Spontaninfektionen auf Zwetschgenbäumen unserer Versuchsanstalt.

Befallen wurden:

1. *Anemone coronaria* L. Die anfälligste Form dieser Art ist offenbar die weit verbreitete Kulturvarietät Caëns, die als Hauptwirt des Haplonten von *Tranzschelia discolor* gelten kann. Die Kulturvarietät St. Brigid erwies sich als etwas weniger anfällig.

2. *Anemone fulgens* (DC.) J. Gay (= *A. pavonina* Lam. × *hortensis* L.). Auch diese Art scheint stark anfällig zu sein.
3. *Anemone blanda* Sch. et K. Diese bedeutend weniger anfällige Art steht systematisch ziemlich weit von *Anemone coronaria* entfernt.

Es ist möglich, daß noch verschiedene andere Arten unserer Zieranemonen als Aecidienwirte der *Tranzschelia discolor* in Betracht kommen.

Nicht befallen wurden:

Anemone ranunculoides L.
Anemone nemorosa L.
Anemone Hepatica L.
Eranthis hiemalis Salisb.
Ranunculus repens L.
Ranunculus bulbosus L.
Ranunculus Steveni Andrz.

Anemone ranunculoides ist also nach diesen negativen Versuchsresultaten kein Aecidienwirt der *Tranzschelia discolor*.

Anemone nemorosa wird in der Literatur gelegentlich als Aecidienwirt der *Tranzschelia pruni spinosae* angegeben. Es handelt sich dabei vermutlich um eine Verwechslung mit dem zu *Ochropsora sorbi* (Oud.) Dietel gehörenden *Aecidium leucospermum* DC. oder sogar mit der Mikroform *Tranzschelia fusca* (Relh.) Dietel, die beide auf *Anemone nemorosa* häufig vorkommen. Die negativen Ergebnisse unserer Versuche wurden auch durch Beobachtungen am Standort der *Tranzschelia pruni spinosae* an der Reppisch bei Dietikon bestätigt (vgl. S. 362).

Anemone Hepatica ist vermutlich ein Aecidienwirt für eine amerikanische Form der *Tranzschelia pruni spinosae* (DUNEGAN, 1938).

Eranthis hiemalis wurde in zahlreichen Versuchen nie befallen. Auch hier dürfte es sich um einen Irrtum handeln, der in der Literatur getreulich durch Jahrzehnte weitergeschleppt wurde. Es handelt sich hier um eine Verwechslung mit dem *Aecidium* der *Puccinia cerasi* (Bér.) Cast. GÄUMANN (1959) führt in seiner Monographie *Eranthis* nicht mehr als Aecidienwirt der *Tranzschelia pruni spinosae* an. Ein Wirtswechsel von *Eranthis hiemalis* auf *Prunus*-Arten wäre unter mitteleuropäischen Verhältnissen überhaupt nicht möglich, weil die Blätter von *Eranthis* schon abgestorben sind, wenn sich die Blattknospen der *Prunus*-Arten entfalten.

In der Literatur werden zahlreiche *Ranunculus*-Arten als Aecidienwirte der *Tranzschelia pruni spinosae* angegeben. Dieser Wirtswechsel dürfte jedoch auf Amerika beschränkt sein.

c) Morphologische Untersuchung des aus den Infektionsversuchen gewonnenen Materials

Nach unsern Infektionsversuchen besteht der Unterschied im Wirtsspektrum der beiden *Tranzschelia*-Arten lediglich darin, daß *T. pruni spinosae* ihre Aecidien ausschließlich auf *Anemone ranunculoides* bildet, während *T. discolor* in ihrer Haplophase verschiedene Zieranemonen, besonders *A. coronaria* und *A. fulgens* befällt. In ihrer Dikaryophase haben beide Arten in Europa das gleiche Wirtsspektrum; es sind höchstens gewisse Unterschiede in der Befallsintensität auf *Prunus spinosa* und *P. domestica* festzustellen.

Anderseits kamen wir aber bei unserer morphologischen Untersuchung der Teleutosporen zu einer klaren Trennung der beiden Arten. Die morphologische Differenzierung scheint also in der Dikaryophase weiter fortgeschritten zu sein als die biologische. Nach der allgemeinen Auffassung werden die biologischen Unterschiede (Spezialisation) den morphologischen untergeordnet.

Angesichts der fehlenden Spezialisation des Dikaryophyten ließ JACKY (1901) die Frage noch offen, ob die beiden Formen genetisch verschieden seien oder ob es sich um Standorts- oder Wirtseinfluß handle. CRISTINZIO (1936), der die große Variabilität der Teleutosporen auf verschiedenen *Prunus*-Arten feststellte und zugleich nachweisen konnte, daß die von ihm untersuchten Formen keine biologische Spezialisation zeigten, mußte deshalb zum Schluß kommen, daß die von ihm beobachteten Variationen nur Matrikalmodifikationen darstellen.

Daß *Tranzschelia discolor* in ihren Teleutosporen sehr variabel ist, konnten wir ebenfalls feststellen. Dagegen ist nach unsern Erfahrungen *T. pruni spinosae*, die von CRISTINZIO nicht untersucht wurde, in ihren morphologischen Eigenschaften viel einheitlicher und konstanter.

Das Krankheitsbild wird bei beiden Formen stark von den Umweltbedingungen und vom Wirt beeinflußt, was CRISTINZIO ebenfalls gezeigt hat. Beide Rostarten können unter bestimmten, aber noch nicht näher bekannten Umständen gelegentlich einen starken Schrotschußeffekt hervorrufen. Das war z. B. in einem Freilandversuch auf der Ebersweier Frühzwetschge (Tab. 4) der Fall. Nicht selten bleibt aber das Gewebe in der Umgebung der Uredo- und Teleutosporenlager länger grün. Auch die Fleckenbildung, eine sehr auffällige Reaktion auf allen *Prunus*-Arten, ist in ihrer Intensität weitgehend von äußeren Faktoren abhängig. Sie ist im allgemeinen auf jungen Blättern stärker als auf alten. Daneben zeigte es sich in unsern Versuchen, daß *Tranzschelia discolor* besonders auf *Prunus domestica* auffälligere und größere Flecke bildet als *T. pruni spinosae* (Abb. 8).

Unsere Infektionsversuche sollten nicht nur das Wirtsspektrum der beiden Formen feststellen, sondern es mußte in erster Linie untersucht werden, ob bei gleichem Ausgangsmaterial immer Teleutosporen der gleichen Form, *Tranzschelia pruni spinosae* oder *T. discolor* gebildet werden. Nur auf diese Weise konnte der Beweis erbracht werden, ob es sich um zwei verschiedene Arten oder um Matrikalmodifikationen handelt, wie CRISTINZIO annimmt.

Am 5. Mai 1958 wurde ein Infektionsversuch mit Aecidiosporen auf *Anemone ranunculoides* von Dietikon eingeleitet. Nach 20 Tagen erschienen die ersten Uredolager auf *Prunus domestica* (FELLENBERG). Am 31. Mai waren alle verwendeten *Prunus*-Arten mit Ausnahme von *P. avium* befallen. Ende Juli erschienen die ersten Teleutosporen. Im Laufe des Sommers wurden von Zeit zu Zeit einzelne Teleutosporenlager auf verschiedenen Wirtspflanzen untersucht. In allen Proben fand ich ausschließlich *Tranzschelia pruni spinosae*. Am 29. Oktober wurde der Versuch aufgehoben, wobei nach eingehender Untersuchung sämtlicher Rostlager folgendes festgestellt wurde:

Auf *Prunus Mahaleb* waren auf gelb verfärbten Blattstellen nur Uredolager vorhanden.

Auf *Prunus spinosa, P. Armeniaca, P. Persica* und *P. cerasifera* (Myrobalana) wurde ausschließlich *Tranzschelia pruni spinosae*, meistens in großen stark stäubenden Lagern gefunden. *Prunus spinosa* zeigte auf der Blattoberfläche über den Sporenlagern auffällige rote Verfärbungen, während auf den beiden anderen Wirtspflanzen keine Verfärbungen oder höchstens kleine nekrotische Flecke sichtbar waren.

Auf *Prunus domestica* (FELLENBERG und ST. JULIEN) traten beide Arten des Pilzes auf dem gleichen Blatt nebeneinander auf. Dabei dominierte *Tranzschelia pruni spinosae* in großen, stäubenden Lagern ohne auffällige Verfärbung des Blattgewebes. Wo auf der Blattoberseite stark verfärbte Stellen auftraten, konnte man auf der Unterseite mit Sicherheit die kleineren, länger geschlossenen Lager der *T. discolor* mit den typischen Sporenballen finden (Abb. 8). Von 184 untersuchten Teleutosporenlagern gehörten 15 (8 %) zu *Tranzschelia discolor*, der Rest war *T. pruni spinosae*.

Dieser Versuch brachte also noch keine Klarheit über die Konstanz der beiden Formen. Sicher war nur, daß das Auftreten von 8 % *T. discolor* nicht auf Wirtseinfluß zurückgeführt werden konnte, denn auf den gleichen Blättern war in überwiegender Zahl auch *T. pruni spinosae* vorhanden. Die Lager der *T. discolor* traten auch nicht nur auf jungen Blättern auf. Es lag daher nahe, an Fremdinfektionen zu denken. Ungefähr 100 m vom Gewächshaus entfernt befand sich eine stark verseuchte Zwetschgenanlage, in der nur

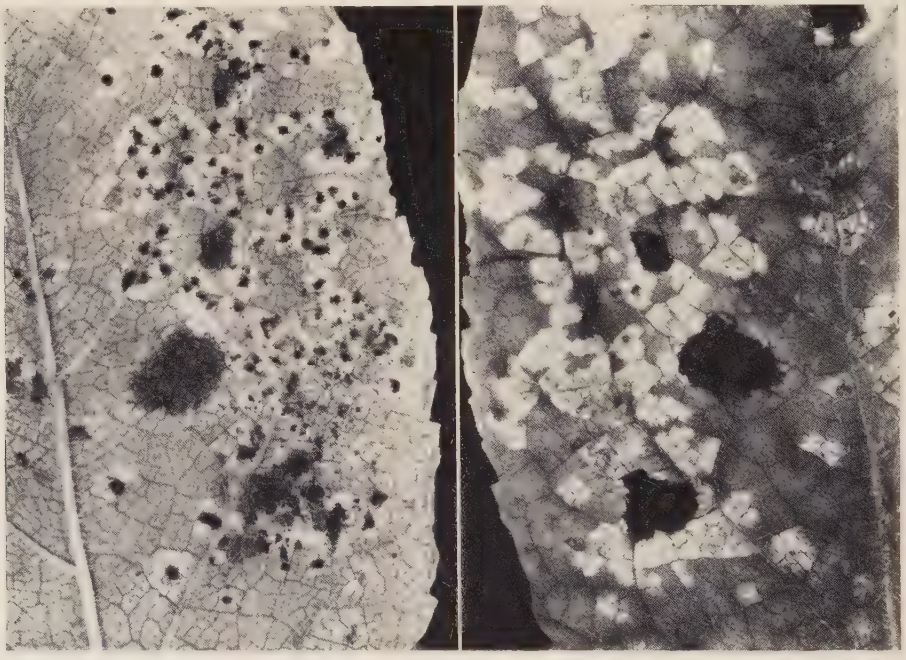

Abb. 8. Mischinfektionen auf *Prunus domestica* St. Julien.
Links: Unterseite, rechts: Oberseite des Blattes. Die großen schwarzen Lager gehören zu *T. pruni spinosae*, die kleinen Lager auf hell verfärbten Stellen zu *T. discolor*

T. discolor vertreten war. Um diese Fehlerquelle auszuschalten, wurde der Versuch im folgenden Jahre mit *T. discolor* wiederholt.

Der folgende Versuch wurde am 18. April 1959 mit Aecidiosporen von *Anemone coronaria* von ANGERS eingeleitet, ein weiterer am 29. April mit Material von Ste. Maynes, Alpes Maritimes von der gleichen Nährpflanze. Im ersten Versuch keimten die Aecidiosporen auf Objektträgern überhaupt nicht, doch erschienen nach 21 Tagen auf *Prunus spinosa* und *P. Persica* die ersten Uredolager. Im zweiten Versuch keimten 80 % der Aecidiosporen. Die Fruktifikationszeit betrug hier nur 13 Tage. Es scheint nicht ausgeschlossen, daß hier ein Zusammenhang mit der guten Keimfähigkeit der Sporen besteht.

In beiden Versuchen wurden alle verwendeten *Prunus*-Arten befallen, nämlich *P. spinosa, P. domestica* (FELLENBERG), *P. Persica* und *P. Mahaleb;* die beiden letzten Arten zeigten allerdings nur einen schwachen Befall. Die ersten Teleutosporen erschienen im ersten Versuch nach 70, im zweiten nach 60 Tagen. Beide Versuche wurden am 10. September aufgehoben.

Prunus spinosa zeigte ein für diese Wirtspflanze ungewöhnliches Befallsbild. Auffällig war eine starke hyperergische Reaktion des Wirtes, die ich beim Befall durch *T. pruni spinosae* nie beobachtete. Auf der Oberseite zeigten sich kleine, eckige, durch die Nervatur begrenzte, gelbe bis rotbraune Flecke, auf der Blattunterseite traten oft starke Nekrosen auf (Abb. 9, links). Die Sporenlager waren klein, die Teleutosporen waren in Ballen verklebt. Die Ausbildung der Basalzelle variierte ziemlich stark, sehr häufig traten steinpilzartige Formen auf, deren Skulptur immer bedeutend schwächer war als bei *T. pruni spinosae* (Abb. 2, rechts). Es handelte sich also sicher um *Tranzschelia discolor*, obwohl die beiden Zellen gelegentlich gleich stark gefärbt waren. Für die Charakterisierung der *T. discolor* sind Skulptur, Form und Größe der Basalzelle wichtigere Merkmale als die Färbung. Die Teleutosporenbildung war viel schwächer als bei *Tranzschelia pruni spinosae.*

Abb. 9. Befall von *Prunus spinosa* durch *T. discolor* (links) und *T. pruni spinosae* (rechts)

Auf *Prunus domestica* wurden ebenfalls nur Teleutosporen der *Tranzschelia discolor* beobachtet. Auffällig war der starke Schrotschußeffekt im Versuch mit Aecidiosporen aus Südfrankreich.

Auf *Prunus Mahaleb* entstanden nur wenige Teleutosporenlager, die unzweifelhaft zu *Tranzschelia discolor* gehörten, während auf *Prunus Persica* ausschließlich Uredosporen gebildet wurden.

Ein Vergleich der Teleutosporen auf *Prunus spinosa* und *P. domestica* aus den Versuchen von 1958 und 1959 zeigte so große Unterschiede, daß man hier sicher nicht von Matrikalmodifikationen sprechen kann. Angesichts der bedeutenden morphologischen Unterschiede dürfen die beiden Formen als gute Arten betrachtet werden.

2. Die Überwinterung des Pilzes

Tranzschelia pruni spinosae tritt wohl überall wo Steinobst kultiviert wird, mehr oder weniger stark auf. Die Verbreitung des Pilzes in der Dikaryophase ist in keiner Weise durch das Vorkommen der anfälligen *Anemone*-Arten begrenzt. CRISTINZIO (1936) fand im Gebiete des Vesuvs nie befallene Anemonen. Trotzdem trat der Rost auf Mandeln, Zwetschgen und Pfirsich häufig auf. Ähnliche Verhältnisse beschreiben JOSIFOVIČ (1953) aus Jugoslawien und PRATELLA und ZANI (1958) aus Oberitalien. Es scheint, daß *Tranzschelia pruni spinosae* in weiten Gebieten nicht mehr in ihrer ursprünglichen langzyklischen Hetereuform, sondern vorwiegend in einer kurzzyklischen, autözischen Form vorkommt. Mit dieser Verkürzung des Entwicklungsganges sind nicht nur die Spermogonien und Aecidien auf Anemonen, sondern auch die Teleutosporen für die Überwinterung und die Verbreitung des Pilzes unnötig geworden. JOSIFOVIČ stellte anderseits fest, daß in Ost- und Nordserbien die Ausbildung der Teleutosporen in zunehmendem Maße unterdrückt wird, während die Uredosporen um so stärker dominieren. Damit müßten mit der Zeit auch die Infektionen auf den Anemonen immer seltener werden. In der Schweiz bestehen keine Anhaltspunkte, daß die Verkürzung des Entwicklungsganges mit einer Reduktion der Teleutosporen im Zusammenhang steht. Mit Ausnahme des Pfirsichs dominieren im Herbst auf allen anfälligen Steinobstarten die Teleutosporen, auch wenn sie in vielen Fällen keine Bedeutung für die Überwinterung des Pilzes haben.

Die Überwinterung des Pilzes in der Dikaryophase kann je nach den klimatischen Verhältnissen und der Art der Wirtspflanzen in verschiedener Weise vor sich gehen.

Es wurde schon mehrfach nachgewiesen, daß die Uredosporen bei tiefen Temperaturen ihre Keimfähigkeit über ein Jahr behalten (DUNEGAN und SMITH 1941). In einem Versuch brachten wir am 30. September rostbefallene Blätter von *Prunus spinosa (Tranzschelia pruni spinosae)* in den Kühlschrank (2 bis 3 °C). Die Proben enthielten etwa 90 % Teleutosporen und 10 % Uredosporen. Am 1. Juni des folgenden Jahres, also nach 8 Monaten wurde die Keimung geprüft und ein Infektionsversuch eingeleitet. Von den Uredosporen keimten 10 % normal, während bei den Teleutosporen keine einzige Keimung beobachtet wurde. Im Infektionsversuch erhielten wir innerhalb der normalen Fruktifikationszeit von 21 Tagen positive Ergebnisse auf Fellenbergzwetschgen und Aprikosen. In wiederholten Versuchen konnten wir nachweisen, daß rostbefallene Blätter, die entweder am Boden oder in Tuchsäckchen überwintert worden waren, noch infektionsfähige Uredosporen beherbergten. Auch an toten jungen Blättern an der Spitze von Trieben können Uredosporen unter unseren Klimaverhältnissen den Winter überdauern und

im Frühjahr wieder junge Blätter infizieren. In unseren stark verseuchten Zwetschgenanlagen findet man im Herbst vom Winde verwehte Uredo- und Teleutosporen auf der Rinde der Stämme und der Zweige, auf Früchten und besonders auch an der Spitze der Knospen. Auch diese Uredosporen können vermutlich im nächsten Frühjahr Primärinfektionen verursachen. Immerhin sind diese Infektionen in hohem Maße vom Zufall abhängig, und es ist deshalb begreiflich, daß sie relativ selten eintreten. Aus diesem Grunde entwickelt sich die alljährliche Verseuchung nur langsam, und sie kann auch ganz ausbleiben, wenn die Bedingungen für die Infektion nicht günstig sind.

In wärmeren Klimaten können Uredosporen den Winter auch an lebenden Blättern überdauern. Dieser Fall kommt nach Barnett (1944) und Smith (1947) in Kalifornien vor.

Endlich kennt man in Kalifornien (Goldsworthy und Smith 1931) und in Neuseeland (Jafar 1958 a) besonders beim Pfirsich die Überwinterung durch Zweiginfektionen, bei denen der Zufall für die Neuinfektionen im Frühjahr sozusagen ausgeschaltet ist. Es sind hier zwei Fälle möglich: Entweder überwintert der Pilz durch Uredosporen, die schon im Herbst auf den Zweigen gebildet wurden, oder es kann nur das Myzel perennieren und im Frühjahr Uredosporen bilden. Diese Art der Überwinterung macht es notwendig, die ersten Infektionen durch eine Spritzung vor dem Austrieb zu bekämpfen. Ob auch in Mitteleuropa Zweiginfektionen vorkommen, ist noch nicht mit Sicherheit nachgewiesen worden. Bei Zwetschgen findet man auf der Rinde einjähriger Triebe nicht selten dunkelrote Flecke, die ganz den Eindruck von Pilzinfektionen machen, doch ist kein Myzel festzustellen. Ob es sich um abortive Infektionen handelt oder ob sich der Pilz erst im Frühjahr entwickelt, müßte noch untersucht werden.

Wenn wir hier die Uredo-Überwinterung in den Vordergrund stellten, so soll damit nicht gesagt sein, daß die Aecidiosporen auf Anemonen für die Primärinfektionen vollständig bedeutungslos seien. Nicolas (1945) beobachtete, daß der Rostbefall bei Aprikosen- und Pfirsichbäumen nach Entfernung der befallenen *Anemone coronaria* zurückging. Im allgemeinen sind kranke Anemonen keine Zierde unserer Gärten, und sie werden schon aus diesem Grunde frühzeitig entfernt. Die Verhältnisse sind also hier für den Obstbau sicher einfacher als etwa beim Gitterrost der Birnbäume, wo der Teleutosporenwirt in jedem Falle eine Gefahr darstellt.

III. ALLGEMEINE ERGEBNISSE

1. Morphologische Differenzierung

Nach den Merkmalen der Teleutospore ist *Tranzschelia pruni spinosae* als die ursprüngliche Form zu betrachten. Zwischen den beiden Zellen der Spore besteht kein Unterschied, und die Spore erweckt damit den Eindruck einer kurzen Sporenkette, der durch die lose Verbindung der beiden Zellen noch verstärkt wird.

Tranzschelia discolor muß dagegen als reduzierte Form aufgefaßt werden. Die Basalzelle der Teleutospore ist hier nach Größe, Form und Skulptur auf einem Jugendzustand stehengeblieben. Die festere Verbindung der beiden Zellen entspricht mehr der Gattung *Puccinia.*

In der folgenden Zusammenstellung sind die Unterschiede der beiden Arten zusammengestellt.

Tabelle 6

Morphologische Unterschiede zwischen *Tranzschelia pruni spinosae* und *T. discolor*

	T. pruni spinosae	*T. discolor*
Blattflecke	wenig ausgeprägt	stärker ausgeprägt
Teleutosporenlager	groß, früh stäubend	kleiner, kompakt, länger geschlossen
Teleutospore	beide Zellen gleich	basale Zelle weniger differenziert
Terminalzelle	Wand überall gleich dick mit dicht stehenden, starken Stacheln	Wand am Scheitel dicker, schwächer skulpiert
Basalzelle	wie apikale Zelle, konstant	stets kleiner als die apikale Zelle, variabel
Form	rundlich, etwas breiter als lang	kubisch oder länglich, stets länger als breit
Wand	überall ziemlich dick	dünner, höchstens an den Seitenflächen etwas verdickt
Skulptur	überall stark stachelig	Stacheln in Zahl und Ausbildung stark reduziert
Farbe	wie Terminalzelle stark dunkelbraun	heller als die Terminalzelle, oft farblos
Stiel der Teleutosporen	nur im jungen Zustand zu Bündeln verklebt, die Sporen werden einzeln frei	bis zur Reife in Bündeln verklebt, das Lager löst sich in einzelne Sporenballen auf

Bei typischer Ausbildung sind die beiden Arten leicht zu unterscheiden, doch kommen bei *Tranzschelia discolor* Zwischenformen vor, die sich in der Ausbildung der Basalzelle der *T. pruni spinosae* nähern.

2. Biologische Differenzierung

Im Vergleich zu den bedeutenden morphologischen Unterschieden sind die biologischen Verschiedenheiten als gering zu bezeichnen. Sie beschränken sich zur Hauptsache auf die Wirtswahl in der Haplophase. In der Dikaryophase bestehen höchstens graduelle Unterschiede im Befall einzelner Wirtspflanzen. Eine so bis in die Einzelheiten gehende Parallelität im biologischen Verhalten muß sicher auffallen, um so mehr, als man allgemein annimmt, daß die biologische Spezialisation der morphologischen Differenzierung vorausgeht.

Die Überwinterung durch Uredosporen kommt ebenfalls bei beiden Arten vor, obwohl sie vermutlich bei *Tranzschelia discolor* eine größere Rolle spielt also bei *T. pruni spinosae*. Durch diese Reduktion des Entwicklungsganges ist aus einer makrozyklischen Euform eine mikrozyklische Form mit Uredo- und Teleutosporen entstanden. In bestimmten Gegenden scheint die Reduktion noch einen Schritt weiter zu gehen. Mit dem Wegfall des Wirtswechsels sind die Teleutosporen bedeutungslos geworden. Es können also auch Pilzstämme erhalten bleiben, die die Fähigkeit, Teleutosporen zu bilden, verloren haben. Bei der Durchsicht von Herbarmaterial muß es auffallen, daß auf dem Pfirsich nur selten Teleutosporen gebildet werden. Goldsworthy und Smith (1931), die in den Jahren 1926 bis 1927 eine Rostepidemie in den kalifornischen Pfirsichanlagen verfolgten, erwähnen, daß sie überhaupt nie Teleutosporen finden konnten. In unseren Versuchen bildeten beide Rostarten auf *Prunus Persica* nur selten Teleutosporen. Josifović (1953) weist darauf hin, daß in Gebieten, wo der Wirtswechsel des Pilzes unterdrückt wird, die Uredosporen stärker dominieren, während die Teleutosporen seltener werden und erst im Herbst auftreten. Diese Tendenz zur Reduktion des Entwicklungsganges und der Sporenformen bei den Uredineen wurde übrigens schon früh erkannt. Sie wird z. B. bei Klebahn (1904) und Ed. Fischer (1904) eingehend diskutiert. Beim Pfirsich- und Zwetschgenrost spielt sich dieser Vorgang sozusagen vor unseren Augen ab.

3. Herkunft und Verbreitung

Als Ausgangsform der beiden Arten dürfte wohl nur die Hetereuform in Frage kommen. Es ist deshalb anzunehmen, daß die beiden Pilze aus Gebieten stammen, in denen die Aecidien- und Teleutosporenwirte nebeneinander vorkommen.

Tranzschelia discolor dürfte vermutlich aus dem östlichen Mittelmeergebiet und Vorderasien stammen, wo der Aecidienwirt (hauptsächlich *Anemone coronaria)* wild wächst und wo zugleich einzelne Steinobstarten wie Mandel, Aprikose und Pfirsich ihre Heimat haben oder doch seit sehr langer Zeit kultiviert werden. Heute hat *T. discolor* mit Hilfe des Menschen eine kosmopolitische Verbreitung erlangt, während Fuckel (1869) diese Art noch als selten bezeichnete. Diese Ausdehnung des Areals war nur möglich, weil sich der Pilz durch Uredo-Überwinterung von seinem Aecidienwirt unabhängig gemacht hat. In weiten Gebieten, z. B. in Kalifornien (Smith und Cochran 1939), ist auf kultivierten *Prunus*-Arten ausschließlich *T. discolor* vorhanden, und es scheint, daß diese Art dort auch auf verschiedene wildwachsende *Prunus*-Arten übergeht.

Aus einem Versuch von Dunegan, Ramsfjell und Gyaerum (1953) geht hervor, daß unsere europäische *Tranzschelia discolor* auch biologisch mit dem amerikanischen Pfirsichrost identisch ist. Sie konnten mit Uredosporen von *Prunus domestica* (St. Julien) aus Norwegen wohl *Prunus Persica,* nicht aber die in Nordamerika wildwachsende *Prunus serotina* infizieren.

Im Gegensatz zu *Tranzschelia discolor* ist bei *T. pruni spinosae* der normale Wirtswechsel zwischen *Anemone ranunculoides* und dem Hauptwirt die-

ser Art, *Prunus spinosa*, in unserer Gegend möglich, weil beide Wirtspflanzen sehr oft nebeneinander vorkommen. Aus dem Areal der beiden Wirtspflanzen darf geschlossen werden, daß *T. pruni spinosae* eine eurasiatische Art ist, deren Hauptverbreitungsgebiet nördlicher liegt als das der *T. discolor*. Weil aber auch *T. pruni spinosae* in der Dikaryophase auf die kultivierten *Prunus*-Arten übergeht, kommt diese Art bei uns besonders bei Zwetschgen- und Aprikosenbäumen vor, auf die sie durch Uredosporen von *Prunus spinosa* aus übertragen wird. Da dieser Wirt und auch *Anemone ranunculoides* in Amerika nicht heimisch sind, ist es begreiflich, daß *Tranzschelia pruni spinosae* in der Neuen Welt auf kultiviertem Steinobst überhaupt nicht vorkommt. SMITH und COCHRAN (1939) fanden diese Art in Kalifornien auch auf wildwachsenden *Prunus*-Arten nicht. Möglicherweise kommt in Nordamerika auf wildwachsenden *Prunus*-Arten eine vikarisierende *Tranzschelia*-Art mit einem anderen Aecidienwirt vor, die offenbar nicht auf kultivierte *Prunus*-Arten übergeht.

Zusammenfassung

1. Auf den kultivierten Steinobstarten (mit Ausnahme der Kirschen) kommen in Mitteleuropa zwei *Tranzschelia*-Arten vor, nämlich:

T. pruni spinosae (Pers.) Diet., mit Aecidien auf *Anemone ranunculoides* und

T. discolor (Fuck.) Tranz. et Litv., mit Aecidien auf *Anemone coronaria, A. fulgens* und anderen *Anemone*-Arten.

2. Beide Arten gehen in ihrer Dikaryophase auf *Prunus domestica, P. Armeniaca, P. Persica, P. cerasifera*, var. *Myrobalana, P. Mahaleb* sowie auf *P. spinosa* über. Innerhalb dieser Wirtsarten besteht keine Spezialisation.

3. Auf kultivierten Steinobstarten kommt *Tranzschelia discolor* in Mitteleuropa häufiger vor als *T. pruni spinosae*.

4. Bei *Tranzschelia pruni spinosae* stimmen die beiden Zellen der Teleutospore in Größe, Form, Skulptur und Farbe vollständig überein. Diese Merkmale sind auch nach Übertragung auf andere Wirtspflanzen konstant. *T. pruni spinosae* kann als primitiver Typus aufgefaßt werden.

5. Bei *Tranzschelia discolor* zeigt die Basalzelle der Teleutospore einen geringeren Grad der morphologischen Differenzierung. Diese Art variiert stärker als *T. pruni spinosae* und kann als eine abgeleitete oder rückgebildete Form bezeichnet werden.

6. Einzelne *Prunus*-Arten, besonders *P. domestica* reagieren stärker auf den Befall durch *Tranzschelia discolor* als auf *T. pruni spinosae*. Auch auf *Prunus spinosa* ist das Befallsbild der beiden Arten deutlich verschieden.

7. Uredo-Überwinterung kommt bei beiden *Tranzschelia*-Arten auch unter unseren klimatischen Bedingungen vor.

Summary

1. In Central Europe two *Tranzschelia*-species are common on cultivated stone fruit trees (except cherries), i. e.:

T. pruni spinosae (Pers.) Diet., with aecidia on *Anemone ranunculoides*, and

T. discolor (Fuck.) Tranz. et Litv. with aecidia on *Anemone coronaria*, *A. fulgens* and other species of *Anemone*.

2. In their dicaryotic stage both species are able to infect *Prunus domestica, P. Persica, P. Armeniaca, P. cerasifera*, var. *Myrobalana, P. Mahaleb* and *P. spinosa*. No biologic specialisation exists within these species.

3. In Central Europe on cultivated stone fruit trees *Tranzschelia discolor* occurs more frequently than *T. pruni spinosae*.

4. In *Tranzschelia pruni spinosae* both cells of the teliospore are exactly alike in size, form, structure of the cell wall and colour. These characteristics remain constant after transmission to other hosts. *T. pruni spinosae* may be designated as a primitive type.

5. By the teliospore of *Tranzschelia discolor* the basal cell shows a lower stage of morphologic differentiation. This species varies much more than *T. pruni spinosae*. *T. discolor* can be regarded as a reduced or a retrogressive form.

6. By some species of *Prunus*, especially *P. domestica* the reaction is heavier by the attack of *Tranzschelia discolor* than by *T. pruni spinosae*. Also on *Prunus spinosa* the symptoms of the two fungi are quite different.

7. In our climatic conditions both *Tranzschelia* species are table to overwinter by means of uredospores.

Literaturverzeichnis

Aderhold, R., 1901: Morphologische Untersuchungen über den Pflaumenrost (*Puccinia pruni* Pers.). Bearbeitet von E. Jacky. In Arbeiten der botanischen Abteilung der Versuchsstation des kgl. pomologischen Institutes zu Proskau. Zbl. f. Bakt. II, 7, 654—662 (speziell p. 658—659).

Arthur, J. C., 1906 a: Cultures of *Uredineae* in 1905. J. of Mycol. **12**, 11—27.

— —, 1906 b: Reasons for desiring a better classification of the *Uredinales*. l. c. **12**, 149 bis 154.

— —, 1906 c: A new classification of the *Uredinales*. l. c. **12**, 188—191.

Barnett, H. L., 1944: Stone fruit diseases in central California. Pl. Dis. Rep. **28**, 424—425.

Blumer, S., 1953: Die Bekämpfung des Zwetschgenrostes. Schweiz. Z. f. Obst- u. Weinbau **62**, 5—9.

— —, 1959: Der Zwetschgenrost. l. c. **68**, 26—30.

Cristinzio, M., 1936: Studio sulla Ruggine delle Drupacee (*Puccinia pruni-spinosae* Pers.). Ricerche, osservazioni e divulgazioni fitopatologiche per la Campagna ed il Mezzogiorno **5**, 46 p.

DELMAS, H. G., 1952: Quelques aspects de la culture de l'abricotier en France. Fruits d'outremer 7, 311—323 (Ref. R. A. M. 33, 161, 1954).

— —, 1955: La rouille de l'abricotier en Roussillon. Phytiatrie-Phytopharm. 4, 31—44.

DUNEGAN, J. C., 1938: The rusts of stone fruits. Phytopathology 28, 411—427.

— —, 1939: Germination experiments with overwintered teliospores of *Tranzschelia pruni-spinosae*. Phytopathology 29, 72—78.

— —, T. RAMSFJELL and H. B. GJAERUM, 1953: Inoculations with uredospores of *Tranzschelia discolor* (Fckl.) Tranz. et Litv. from Norway. Pl. Dis. Rep. 37, 88.

— —, and C. O. SMITH, 1941: Germination experiments with uredo and teliospores of *Tranzschelia pruni-spinosae discolor*. Phytopathology 31, 189—191.

— —, and J. WAHL, 1956: Inoculations with aecidiospores of *Tranzschelia discolor* from Israel. Pl. Dis. Rep. 40, 771.

FISCHER, ED., 1904: Die Uredineen der Schweiz. Beitr. z. Kryptogamenflora der Schweiz, Bd. 2, Heft 2, 157—159 und 547—549.

— —, 1925: Einiges über den Pflaumenrost. Schweiz. Obst- und Gartenbauztg. 27, 355—357.

FUCKEL, L., 1869: Symbolae Mycologicae, Wiesbaden.

GÄUMANN, E., 1959: Die Rostpilze Mitteleuropas mit besonderer Berücksichtigung der Schweiz. Beitr. Kryptogamenflora der Schweiz 12, 200—205, Büchler & Co., Bern.

GOLDSWORTHY, M. C., and R. E. SMITH, 1931: Studies on a rust of Clingstone peaches in California. Phytopathology 21, 133—168.

GREGORY, P. H., 1949: Leaf diseases of *Anemone coronaria* in Cornwall. Trans. Brit. Myc. Soc. 32, 241—245.

JACKY, E., s. ADERHOLD, R.

JAFAR, H., 1958 a: Studies on the biology of peach rust (*Tranzschelia pruni spinosae* Pers.) in New Zealand. New Zealand J. Agr. Res. 1, 642—651.

— —, 1958 b: Investigation on the control of peach rust (*Tranzschelia pruni spinosae* Pers.). l. c. 1, 660—664.

JOSIFOVIČ, M., 1946: Protecting plum trees from attack by *Puccinia pruni-spinosae* Pers. and *Taphrina pruni* (Fuck.) Tul. Ann. Travaux Agr. Sci. Belgrade n. s. 1, 3—10 (Ref. R. A. M. 1948: 26—27).

— —, 1953: Le rôle du stade écidien dans l'évolution de *Tranzschelia pruni spinosae* (Pers.) Diet. Glas. Acad. Serbe Sci. 210, Classe des Sci. math. et nat. 7, 223—235.

KLEBAHN, H., 1904: Die wirtswechselnden Rostpilze. Berlin.

KRIEG, W., 1907: Versuche mit Ranunculaceen bewohnenden Aecidien. Zbl. Bakt. II, 17, 208—209.

MAGNIN, A., 1890: Sur la castration parasitaire de l'*Anemone ranunculoides* par *l'Aecidium leucospermum*. C. R. Acad. Sci. 110, 913—915.

MAGNUS, P., 1891/92: Über den Einfluß, den die Vegetation einiger parasitischer Pilze auf die Ausbildung der Blütenteile ausübt. Verh. Bot. Verein Prov. Brandenburg 33, 6—8.

NICOLAS, G., 1945: Observations sur *Tranzschelia pruni spinosae*. Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse 80, 170—176.

PRATELLA, G., e F. ZANI, 1958: La ruggine del pesco. Rivista frutticoltura 20, Nr. 2.

SCOTT, C. E., and G. L. STOUT, 1931: *Tranzschelia punctata* on cultivated anemones in the Santa Clara Valley. Phytopathology 21, 998.

SMITH, C. O., 1945: Inoculations of the evergreen species of *Prunus Laurocerasus* with *Tranzschelia pruni spinosae*. Phytopathology 35, 572—574.

— —, 1947: A study of *Tranzschelia pruni spinosae* on *Prunus* species in California. Hilgardia 17, 251—266.

Smith, C. O., and L. C. Cochran, 1939: Rusts on the California native pruni. Phytopathology **29**, 645—646.

Tranzschel, W., 1903: Über die Möglichkeit, die Biologie wirtswechselnder Rostpilze auf Grund der morphologischen Merkmale vorauszusehen. Travaux Soc. Imp. des Naturalistes St. Petersburg, C.-R. des Sci. **34**, 286—297 (deutsche Zusammenfassung 311 bis 312).

— —, und M. Litvinov, 1939: Die Rostpilze aus der Gattung *Tranzschelia* auf den Prunoideen. J. de Bot. **24**, 247—253.

Viennot-Bourgin, G., 1949: Les champignons parasites des plantes cultivées. Bd. II, 1115 bis 1121.

Yarwood, C. E., 1951: Defoliation by a rain-favored, a dew-favored and a shade favored disease. Phytopathology **41**, 194—195.

Zobrist, L., und E. Hoffmann, 1953: Die Bekämpfung des Zwetschgenrostes mit Zineb. Phytopath. Z. **21**, 79—82.

Zwirn-Hirsch, H. E., 1946: Infection Experiments with aeciospores of *Tranzschelia pruni spinosae* (Pers.) Diet. in Palestine. J. Bot. **3**, 178—179.

Aus dem Institut für Forstnutzung und Forstschutz Tharandt der TH Dresden

Institutsdirektor: Prof. Dr. Zieger

Beiträge zur Fluorschadendiagnostik

II. Ermittlung fluorhaltiger Immissionen durch Nachweis der Speicherung von Fluor in der Baumrinde

Von

F. Lampadius

Inhalt: Einleitung. — Untersuchungsmethode. — Untersuchungsverfahren. — Untersuchungsergebnisse. — Der native Fluorgehalt der Rinde. — Der Fluorgehalt der Rinde der Bestockung eines nahezu ebenen Gebietes mit fluorhaltiger Immission. — Der Fluorgehalt der Rinde der Bestockung eines kesselartigen Gebietes mit fluorhaltiger Immission. — Gegenüberstellung des Fluornachweises in Blättern und Nadeln mittels Kristallfällungsmethode und in Rinden mittels Thorium-Titrationsmethode. — Kontrolluntersuchungen. — Zusammenfassung und Schlußfolgerungen. — Summary. — Literaturverzeichnis.

EINLEITUNG

Bredemann und Radeloff (1937) haben nachgewiesen, daß die Sprosse der Bäume und Sträucher bei Einwirkung fluorhaltiger Immissionen, gleichgültig ob während der Vegetationszeit oder während der Winterruhe, erhebliche Mengen von Fluorverbindungen in wasserlöslicher und -unlöslicher Form in ihrer Rinde speichern. Diese in der Rinde gespeicherten Fluorverbindungen diffundieren nicht durch die Markstrahlzellen in die Leitungsbahnen des Holzkörpers, gelangen also auch nicht in die austreibenden Sprosse, Blätter und Blüten. Beide Autoren kamen daneben zu der Feststellung, daß Fluor aus fluorhaltigem Boden durch die Sprosse, Blätter und Blüten nicht aufgenommen wird, jedenfalls nicht in Mengen, die mit der Kristallfällungsmethode nachweisbar sind, daß es also auf diesem Wege auch nicht in der Rinde gespeichert wird. Das aus der Nähe einer gefährlichen Fluorrauchquelle stammende Untersuchungsmaterial enthielt noch längere Zeit nach der Entnahme in der Rinde erhebliche Mengen Fluor.

Im Anschluß an eine Explosion des Flußsäurekessels eines chemischen Betriebes konnte Verfasser die nach wenigen Tagen eingetretene Nekrose sämtlicher Blätter eines Holunderstrauches (*Sambucus nigra* L.) beobachten, der vom Kessel etwa 100 m entfernt und nur wenige Minuten den hochkonzentrierten Schwaden der ausströmenden Flußsäuredämpfe ausgesetzt gewesen war. Ein in gleicher Entfernung etwa 30 m seitlich davon stehender,

gleich alter Strauch derselben Art wurde von diesen Gasschwaden nicht getroffen und zeigte keine Blattschäden. Der geschädigte Strauch bildete bereits nach 3 bis 4 Wochen neue Blätter, so daß ihm der infolge der Kesselexplosion zugefügte Schaden äußerlich schon bald nicht mehr anzusehen war. Die mehrere Monate nach der Kesselexplosion durchgeführte Untersuchung beider Sträucher stellte erhebliche Mengen Fluor in der Rinde des geschädigten Strauches fest (3,10 mg F/5 g Rinde), während die gleiche Untersuchung beim ungeschädigten Strauch nur einen verschwindend geringen Fluorgehalt der Rinde ergab, der annehmbar dem nativen Fluorgehalt der Rinde entsprach.

An diesem von Bredemann und Radeloff erkannnten und durch eine zufällige Beobachtung des Verfassers bestätigten Vorgang der Speicherung des Fluors aus der Luft in der Rinde der Bäume und Sträucher knüpften in den Jahren 1957 bis 1959 Untersuchungen des Institutes für Forstschutz Tharandt der TH Dresden an. Ihnen lag die Frage zugrunde, ob sich durch die Menge des in der Rinde festgestellten Fluors die Stärke der Einwirkung fluorhaltiger Immissionen auf die Vegetation beweisen läßt. Im folgenden wird über den bei diesen Untersuchungen eingeschlagenen Weg und die dabei bisher erzielten vorläufigen Ergebnisse berichtet.

1. Untersuchungsmethode

Bredemann und Radeloff (1937) haben sich zum Nachweis des in der Baumrinde gespeicherten Fluors der mikrochemischen Methode der Kristallfällung des Fluors als Natriumsilicofluorid bedient. Diese Methode erlaubt auch bei Verwendung der Mühlsteph-Skala (Bredemann 1956, S. 193) nur eine orientierende qualitative Fluorbestimmung. Sie hat den Vorteil geringer Empfindlichkeit und wird dementsprechend nicht von dem mehr oder weniger geringen nativen Fluorgehalt der Pflanze gestört. Wir mußten diesen Vorteil vor der Notwendigkeit einer exakten quantitativen Bestimmung des Fluorgehaltes begaster Rinden zurücktreten lassen. Ausgehend von der Zirkonalizarinmethode zum Zwecke des kolorimetrischen Fluornachweises gelangten wir zur quantitativen Bestimmung des Fluors in der Rinde mittels Zirkon-Titration. Wegen der im Laufe unserer Untersuchungen eingetretenen Schwierigkeiten bei der Beschaffung von Zirkonsalz mußten wir zur Thorium-Titration übergehen. Diese von Willard und Winter (1933) vielfach erprobte titrimetrische Methode erwies sich grundsätzlich als geeignet für den quantitativen Nachweis von Fluor in der Rinde. Anfängliche methodische und materialbedingte Unzulänglichkeiten machten die Überprüfung ihrer Anwendung notwendig. Dabei gelangten wir zu einer Eichkurve, die ausgehend vom Thoriumnitratverbrauch den gesuchten Fluorwert anzeigt. Die Abweichungen der Wertepunkte von den Eichgeraden betrugen im Mittel weniger als 0,1 mg Fluor, womit die Genauigkeit für unsere Zwecke ausreichend erschien[1]).

1) Für die Beratung und Unterstützung bei der Sicherung unseres methodischen Weges sei den Herren Dr. chem. Steuer und Dipl.-Chem. Herrmann (Inst. f. Pflanzenchemie u. Holzforschung und Institut f. Forstschutz Tharandt) auch an dieser Stelle gedankt.

2. Untersuchungsverfahren

Die auf ihren Fluorgehalt zu untersuchenden Rinden wurden von Bäumen und Sträuchern im Umkreis einzelner Industriebetriebe gewonnen, die schon seit langem als Emittenten fluorhaltiger Abgase erkannt sind. Die Entnahme erfolgte auf der der Emissionsquelle zugekehrten Baumseite etwa 1 bis 2 m über dem Boden. Dabei wurde die Entnahme auf die Borke beschränkt und die Einbeziehung von Holz- und Splintteilen in die Rindenprobe vermieden. Die Entnahmestellen wurden, vom Emittenten aus gesehen, nach Himmelsrichtung und Entfernung gegliedert und abgestuft. Ihre Auswahl berücksichtigte weitgehend den Einfluß der Geländeausformung und der Bebauung auf die bodennahen Luftströmungen. Eine Unterscheidung der Rindenproben nach dem Zeitpunkt der Probeentnahme (Vegetationszeit oder Winterruhe) wurde zunächst vernachlässigt. Die Probeentnahmen erstreckten sich vorwiegend auf Laubhölzer, weil im Immissionsbereich der für unsere Untersuchungen in Frage kommenden Industriebetriebe Nadelhölzer nicht mehr oder nur noch vereinzelt anzutreffen waren. Auch die Rindenproben der Laubhölzer mußten stellenweise auf die wenigen Laubholzarten beschränkt bleiben, die bisher der Einwirkung der fluorhaltigen Abgase hatten standhalten können. Bei dieser Sachlage war es leider nicht möglich, bei der Feststellung des Fluorgehaltes begaster Rinden nur eine Laubholzart zu verwenden.

Bei der chemischen Analyse der Rindenproben bedienten wir uns der Arbeitsweise von SCHUCH (1953), die er bei der Bestimmung des Fluorgehaltes von mit Fluoriden bzw. Silikofluoriden imprägnierten Hölzern angewendet hatte. Dabei destillierten wir einheitlich 5 g jeder Rindenprobe nach Lufttrocknung in feingemahlenem Zustande und stellten je Rindenprobe 300 ml Destillat her. Davon wurden 2 Teilmengen von je 100 ml titriert und die Restmenge bis zum Abschluß der Analyse zur Kontrolle aufbewahrt. Der Fluorgehalt der Probe entspricht dem arithmetischen Mittel des Titrationsergebnisses der beiden Teilmengen von je 100 ml Destillat. Bei Benutzung eines Destillationskolbens und einer Titrationsvorrichtung konnten je Arbeitstag rund 5 Proben analysiert werden. Wir stellten bei unseren bisherigen Untersuchungen den Fluorgehalt von rund 80 Rindenproben fest. Daneben wurden noch etwa 100 Rindenproben aus Kontrollgründen wiederholt analysiert.

3. Untersuchungsergebnisse

Unsere Untersuchungen sollten klären, ob der Grad der Speicherung von Fluor aus der Luft in der Rinde der Bäume und Sträucher artspezifisch ist, oder ob er auch umweltbedingte Relationen zur Emissionsquelle anzeigt.

a) Der native Fluorgehalt der Rinde

Wenn auch in der Literatur (BREDEMANN 1956) sehr vielseitige, allerdings sich auch häufig widersprechende Angaben über den nativen Fluorgehalt ganzer Pflanzen und einzelner Pflanzenteile zu finden sind, so fehlen

spezielle, diese Frage grundlegend beantwortende Angaben über den nativen Fluorgehalt der Rinde. GAUTIER (von SCHARRER [1941, 1944] zitiert) und NOMMIK (1953) stellen fest, daß die Stengel der Pflanze im Vergleich mit deren Wurzeln einen niedrigeren nativen Fluorgehalt haben, woraus geschlossen werden darf, daß der native Fluorgehalt der Rinde den der anderen oberirdischen Pflanzenteile im allgemeinen nicht übersteigt. Um annähernd klarzustellen, in welcher Größenordnung sich der native Fluorgehalt von Bäumen aus Gebieten ohne fluorhaltige Immissionen bewegt, untersuchten wir 8 Proben (T 1 bis T 8) entsprechender Herkunft. Diese stammten von 60 bis 90jährigen Lärchen (6), Birken (1) und Linden (1) eines engbegrenzten gleichartigen Standorts. Der Fluorgehalt dieser 8 Proben lag ausnahmslos $< 0{,}2$ mg/100 ml Destillat, so daß wir im weiteren Verlauf unserer Untersuchungen zunächst unterstellten, daß ein Fluorgehalt der Rinde $< 0{,}2$ mg/100 ml Destillat nativen Ursprungs ist.

b) Der Fluorgehalt der Rinde der Bestockung eines nahezu ebenen Gebietes mit fluorhaltiger Immission

Die Schädigung der Vegetation durch fluorhaltige Abgase geht hier seit vielen Jahren von einem kleinen chemischen Betrieb aus, dessen Flußsäureproduktion sich auch heute noch unter rückständigen technischen Voraussetzun-

Probe	Alter in Jahren	Holzart	Entfernung zur Rauchquelle in m	Himmelsrichtung	Fluorgehalt in mg/5 g Rinde
GL 14	10	*Sambucus nigra* L.	75	nordostwärts des Betriebes	11,25
13	10	*Sambucus nigra* L.	75	nordostwärts des Betriebes	12,50
28	5	*Sambucus nigra* L.	100	ostwärts des Betriebes	5,28
5	20	*Prunus domestica* L.	100	nordostwärts des Betriebes	2,97
6	5	*Sambucus nigra* L.	130	nordostwärts des Betriebes	2,82
8	25	*Robinia pseudo-acacia* L.	150	ostwärts des Betriebes	1,68
4	25	*Populus robusta* Schneider (tot)	200	ostwärts des Betriebes	2,40
3	25—30	*Populus robusta* Schneider	200	ostwärts des Betriebes	1,92
2	25—30	*Populus robusta* Schneider	250	ostwärts des Betriebes	1,28
1	25—30	*Populus robusta* Schneider	250	ostwärts des Betriebes	1,14
24	50	*Aesculus hippocastanum* L.	650	ostwärts des Betriebes	$< 0{,}2$ mg/100ml Dest.
25	50	*Acer platanoides* L.	650	ostwärts des Betriebes	$< 0{,}2$ m/100ml Dest.

gen abwickelt. Das bewirkt vor allem in der Hauptwindrichtung SW — NE starke Nahschäden und hat zu weitgehender Verringerung des Baumbestandes im Lee dieses Betriebes geführt. Die von den wenigen noch vorhandenen Bäumen und Sträuchern entnommenen Rinden zeigen in ihrem Fluorgehalt eindeutig ein Gefälle entsprechend der Entfernung vom Betrieb in Richtung SW — NE (siehe Proben Gl 14 bis 25).

Im Luv dieses Betriebes grenzt unmittelbar dichtbebautes Gebiet an, das zusammen mit einem hohen Eisenbahndamm die weiter westlich davon vorkommende Baumbestockung gegen die Einwirkung fluorhaltiger Abgase abschirmt. Die hier, 500 bis 1000 m westlich der Emissionsquelle, von den gleichen Holzarten etwa gleichen Alters entnommenen 5 Rindenproben hatten sämtlich einen Fluorgehalt von $<$ 0,2 mg/100 ml Destillat.

c) Der Fluorgehalt der Rinde der Bestockung eines kesselartigen Gebietes mit fluorhaltiger Immission

In diesem kesselartigen Untersuchungsgebiet befindet sich etwa am tiefsten Punkt ein Großbetrieb, der fluorhaltige Produkte erzeugt und der durch seine fluorhaltigen Emissionen Pflanzen und Tiere der Umgebung schon seit vielen Jahren ernstlich schädigt. Dabei spielt neben der wechselnden Intensität des Ausstoßes fluorhaltiger Gase und Stäube die Geländeausformung des Schadgebietes für die Graduierung der Vegetationsschäden offensichtlich eine ausschlaggebende Rolle. Diese besonderen lokalen Verhältnisse berücksichtigten wir bei der Auswahl der Entnahmestellen für die Rindenproben.

Auf einem dem Betrieb in etwa 150 m Entfernung westlich vorgelagerten Steilhang (Prallfläche), dessen Laubholzbestockung während der letzten 20 bis 30 Jahre infolge Einwirkung der Abgase abgestorben ist, stand uns für unsere Untersuchung noch eine 70jährige, ebenfalls seit mehreren Jahren schon abgestorbene Ulme zur Verfügung. Die Rinde dieses Baumes (D 16) hatte einen Fluorgehalt von 16,35 mg/5 g.

Im Rücken dieses Steilhanges befindet sich dichtbebautes Gelände, in das die Abgase nur im Verlauf eines engen, gewundenen Talzuges eindringen können. Etwa 750 m (Luftlinie) nördlich des emittierenden Betriebes trafen wir hier auf typische Fluorschäden an Früchten des Birnbaumes und Blättern der Weinrebe (*Vitis vinifera* L.). Etwa an gleicher Stelle von einer 50jährigen Pappel (D 46) und einer 75jährigen Lärche (D 1) entnommene Rindenproben ergaben 2,16 bzw. 1,26 mg F/5 g Rinde.

Im Verlauf eines muldenartigen, aus Richtung SW in die Kessellage einmündenden Bachtälchens verfolgten wir durch Untersuchung von 23 Rindenproben bis nahezu 2 km westlich des Betriebes die Speicherung von Fluor in der Baumrinde. Wie nicht anders zu erwarten, ergab sich dabei keine einheitliche, allmähliche Verringerung des Fluorgehaltes der Rinde entsprechend der Zunahme der Entfernung vom Werk. Die Fluorgehaltswerte schwankten hier unabhängig von der Entfernung bis zur Emissionsquelle zwischen 2,04 und 0,72 mg/5 g Rinde und bewegten sich häufig auch unterhalb 0,2 mg/100 ml Destillat. Durch diese Feststellungen sehen wir unsere wiederholt gemachte Beobachtung bestätigt, daß wohl bei gewissen Witterungsverhältnissen die

Abgase schwadenartig in dieses Bachtal eindringen können, im allgemeinen jedoch durch die Hauptwindrichtung davon abgehalten werden und sich statt dessen ostwärts oder talabwärts in nördlicher Richtung ausbreiten.

Das kesselartige Gebiet, in dessen Mittelpunkt der emittierende Betrieb liegt, geht nur im Osten allmählich in eine breite, nahezu unbestockte Wiesenmulde über, durch die die Abgase am häufigsten vom Winde abtransportiert werden. Wir stellten hier, im Lee des Betriebes, zwischen 250 bis 600 m Entfernung vom Betriebe an 12 verschiedenen Laubholzarten den Fluorgehalt der Rinde fest. Abgesehen von einer 30jährigen Birke (D 19) mit nur 1,68 mg F/5 g Rinde (siehe hierzu das Ergebnis der Kontrolluntersuchung unter 35) bewegte sich der Fluorgehalt der übrigen Proben zwischen 3,18 und 7,65 mg/5 g Rinde, das ist im Mittel 4,93 mg/5 g Rinde. Dabei zeigte sich innerhalb dieses Entfernungsbereiches keine eindeutige Abnahme des Fluorgehaltes der Rinde entsprechend der Zunahme der Entfernung vom Betriebe. Dieses Untersuchungsergebnis erlaubt die Annahme, daß in dieser Wiesenmulde nicht nur eine wesentliche Abzugsstraße für die Abgase zu sehen ist, sondern daß sich trotz zunehmender Entfernung von der Abgasquelle die Konzentration der Abgase auch hier nur zögernd verringert.

d) Gegenüberstellung des Fluornachweises in Blättern und Nadeln mittels Kristallfällungsmethode und in Rinden mittels Thorium-Titrationsmethode

Im engeren Umkreis eines kleinen Betriebes, der infolge der Behandlung von Glaswaren im Ätzverfahren fluorhaltige Emissionen geringen Umfanges ausstößt, entnahmen wir zum Nachweis der Vegetationsschädigung durch Fluor zu gleicher Zeit neben Blättern und Nadeln auch Baumrinde von verschiedenen Holzarten. Diesem Material wurden Blätter, Nadeln und Baumrinde derselben Holzarten aus einer Lage ohne fluorhaltige Immissionen, etwa 1000 m ostwärts des Betriebes, gegenübergestellt. Bei Anwendung der Kristallfällungsmethode, mit der nur ein qualitativer Fluornachweis möglich ist, bewegte sich der Fluorgehalt der begasten Blätter und Nadeln entsprechend der Mühlsteph-Skala vorwiegend innerhalb der Stufen 2 (deutliche Kristallbildung) und 3 (starke Kristallbildung), vereinzelt innerhalb der Stufe 1 (Spuren, einzelne Kristalle).

Bei den Blättern und Nadeln aus dem Bereich ohne fluorhaltige Immissionen fiel der Fluornachweis mit dieser Methode ausnahmslos negativ (Stufe 0) aus. Die Feststellung des Fluorgehaltes der Rinden brachte bei Anwendung der Thorium-Titrationsmethode folgende Ergebnisse:

Im Bereich der fluorhaltigen Immission

Probe			
O III	*Sambucus nigra* L.	25 m südwestlich des Betriebes	1,8 mg F/5 g Rinde
O IV	*Aesculus hippocastanum* L.	70 m südwestlich des Betriebes	0,9 mg F/5 g Rinde
O V	*Sambucus nigra* L.	300 m nordöstlich des Betriebes	< 0,2 mg F/100 ml Dest.

Im Bereich ohne fluorhaltige Immission

O I	*Aesculus hippocastanum* L.	1000 m ostwärts des Betriebes	< 0,2 mg F/100 ml Dest.
O II	*Sambucus nigra* L.	1000 m ostwärts des Betriebes	< 0,2 mg F/100 ml Dest.

Diese Untersuchung zeigt, daß beide Untersuchungsmethoden, nebeneinander angewandt, geeignet sind, ein Gebiet, das unter der schädigenden Einwirkung von fluorhaltigen Abgasen steht, mit ziemlicher Zuverlässigkeit abzugrenzen.

e) Kontrolluntersuchungen

Bei der Thorium-Titrationsmethode ist die Endpunkterkennung unvermeidbar von subjektiven Einflüssen abhängig. Wir waren bemüht, dies möglichst auszuschließen, indem wir die Rindenanalysen nur von ein- und derselben Laborantin durchführen ließen, die sich zur Kontrolle der Feststellung des Farbumschlagbeginnes des Destillates einer entsprechenden Farbvergleichslösung zu bedienen hatte. Zur Prüfung der Zuverlässigkeit dieser Titrationsmethode wiederholten wir bei 5 willkürlich herausgegriffenen Rindenproben die Fluoranalyse nach 4 bis 5 Monaten, ohne daß die Laborantin davon Kenntnis hatte, um welche Rindenproben es sich dabei handelte.

Probe D 34	Analyse am 17. 2. 1959	5,34 mg F/5 g Rinde
	Analyse am 2. 7. 1959	6,00
D 35	Analyse am 14. 2. 1959	11,40
	Analyse am 30. 6. 1959	9,00
D 36	Analyse am 13. 2. 1959	2,52
	Analyse am 30. 6. 1959	2,52
D 49	Analyse am 9. 2. 1959	< 0,2 mg F/100 ml Destillat
	Analyse am 2. 7. 1959	< 0,2
D 50	Analyse am 9. 2. 1959	1,20 mg F/5 g Rinde
	Analyse am 2. 7. 1959	0,60

Die Probe D 36 war außerdem schon am 10. 9. 1958 mit dem gleichen Ergebnis von 2,52 mg F/5 g Rinde analysiert worden.

Die Zuverlässigkeit der Thorium-Titrationsmethode prüften wir außerdem bei 4 willkürlich herausgegriffenen Rindenproben durch Berechnung des mittleren Fehlers (m) der Analysenergebnisse jeder dieser Proben. Zu diesem Zwecke stellten wir von jeder Probe unabhängig voneinander 5 × 300 ml Destillat her, so daß für jede Probe 10 Titrationen zu je 100 ml durchgeführt werden konnten. Die von jeder Destillation für die betreffende Probe übrigbleibende Menge von 100 ml Destillat wurde bis zum Abschluß der Untersuchung für Kontrollzwecke aufbewahrt. Die Ablesungen des Thoriumnitratverbrauches je 100 ml Destillat bzw. die entsprechenden Ablesungen des F-Gehaltes in der Eichkurve wurden für 10 Titrationen je Probe rechnerisch zusammengefaßt und daraus die Streuung des Mittelwertes bzw. der mittlere Fehler berechnet.

Die bei dieser Kontrolluntersuchung für die Proben D 15, D 17 und Gl 6 durch eine Reihenuntersuchung gefundenen Mittelwerte des Fluorgehaltes stimmen nahezu mit dem Analysenergebnis überein, das bereits Monate vorher bei der Einzelanalyse dieser Proben ermittelt worden war (D 15 = 2,04 mg, D 17 = 7,65 mg, Gl 6 = 2,82 mg).

		Mittelwert (M)	Streuung des Mittelwertes (M)	
			±	%
Probe D 15	*Larix decidua* Miller	1,94 mg F/5 g Rinde	0,0657 mg	3,39
D 17	*Tilia cordata* Miller	7,26	0,2304	3,17
D 19	*Betula pendula* Roth	3,46	0,0224	0,65
Gl 6	*Sambucus nigra* L.	2,78	0,02	0,72

Zusammenfassung und Schlußfolgerungen

1. Zur Ermittlung des Fluorgehaltes der Rinde wurde die Thorium-Titrationsmethode angewendet, deren Zuverlässigkeit durch Aufstellung einer Eichkurve gesichert wurde. Die Ergebnisse der Rindenanalysen wurden durch verschiedene Kontrolluntersuchungen überprüft. Es zeigte sich bei 4 Kontrollproben mit je 10 Titrationen, daß sich der mittlere Fehler zwischen 0,65 und 3,39 % bewegt.

2. Die Frage, welcher Fluorgehalt der Rinde als nativ angesehen werden kann, ist zur Zeit noch ungeklärt. Verschiedene Hinweise in der Literatur berechtigen zu der Annahme, daß die Speicherung von Fluor in der Rinde (Borke) vom Sproß her mengenmäßig unerheblich sein dürfte. Die Untersuchungen an Baumrinden aus einem Gebiet ohne fluorhaltige Immission ergaben bei allen Proben $< 0{,}2$ mg F/100 ml Destillat. Dieser Fluorgehalt wurde zunächst als Grenzwert für den nativen Fluorgehalt der Rinde unterstellt.

3. Bei der Entnahme der Rindenproben in Gebieten mit fluorhaltiger Immission ließen wir uns von den Umweltverhältnissen leiten, von denen besondere Einflüsse auf die Fluorspeicherung in der Rinde zu erwarten waren. Die Zahl der Holz- und Straucharten, von denen Rindenproben gewonnen werden konnten, war abhängig von der Größe der den Fluorabgasen noch nicht zum Opfer gefallenen Bestände. Die Untersuchung des Fluorgehaltes der Rinde erstreckte sich nur auf die Borke und wurde in mg F auf 5 g lufttrockenes Rindenmehl berechnet. Die Unterscheidung der Rindenproben nach dem Zeitpunkt der Entnahme wurde zunächst vernachlässigt, untersucht wurden rund 80 Rindenproben.

4. Die bisherigen Ergebnisse zeigen eindeutig eine Relation zwischen Menge des in der Rinde gespeicherten Fluors und Entfernung bzw. Exposition der Entnahmestelle zur Emissionsquelle. Bei hoher Fluor-Emission und ungünstiger Belüftung des Schadengebietes wurde noch in weiterer Entfernung von der Emissionsquelle Fluor in beträchtlicher Menge in der Rinde festgestellt. Die qualitative Ermittlung des Fluorgehaltes begaster Blätter und Nadeln mit der Kristallfällungsmethode, gleichzeitig neben der quantitativen Ermittlung des Fluorgehaltes begaster Rinden mit der Thorium-Titrationsmethode, führte zu übereinstimmenden Ergebnissen, so daß dadurch das in Frage kommende Schadengebiet ausreichend zuverlässig abgegrenzt werden konnte.

5. Unseren Untersuchungsergebnissen kommt vorläufige Bedeutung zu, weil zunächst nachgeprüft werden sollte, ob die Speicherung von Fluor aus der Luft in der Rinde von der Intensität der fluorhaltigen Emission unmittelbar abhängig ist. Unsere Ergebnisse erlauben, dieses Fluornachweisverfahren bereits jetzt in Verbindung mit anderen Verfahren bei der Diagnose von Rauchschäden anzuwenden.

Summary

Contributions on the diagnosis of fluorine damage
II. Estimation of fluorine-containing emissions by demonstration of the storage of fluorine in the cortex of trees

1. The thorium titration method was employed for estimating the fluorine content of the cortex, the reliability of the method being checked by the preparation of a standard curve. The results of the cortex analyses were checked by a number of control investigations. The results of 4 control samples with 10 titrations each showed that the mean error fluctuates between 0.65 and 3.39 %.

2. The question as to what fluorine content in the bark is to be regarded as natural has not yet been exactly established. Various indications in the literature lead to the assumption that the storage in the cortex (bark) of fluorine from the shoot is quantitatively negligible. Investigations of the cortex of trees from an area without fluorine-containing emissions gave < 0.2 mg. F/100 ml. distillate in all samples. This fluorine content was initially taken as the limit for the natural fluorine content of the cortex.

3. In taking bark samples in areas with fluorine-containing emissions we were guided by the environmental factors that were expected to exert a particular influence on the storage of fluorine in the cortex. The number of woody and bushy species from which bark samples could be taken was conditioned by the number of stands that had not yet been destroyed by fluorine-containing waste gases. The investigation of the fluorine content of the cortex extended only to the bark and was calculated in mg. of F in 5 g. of air-dry ground bark. Distinction of the bark samples according to the time of taking the sample was at first omitted; some 80 bark samples were investigated.

4. The results to date show a clear relation between the quantity of fluorine stored in the bark and the distance of the point of sampling from the source of emission and its disposition to it. With high fluorine emission and unfavourable wind conditions in the affected area fluorine was found in considerable quantities in the bark at places quite a long way from the source of emission. The qualitative estimation of the fluorine content of gased leaves and needles by the crystal precipitation method, and the quantitative estimation of the fluorine content of gased bark by the thorium titration method led to results that were in good agreement, so it was possible in this way to define the area in which damage may occur with reliable accuracy.

5. The results of our investigations are of preliminary importance since it is necessary to determine whether the storage of fluorine from the air in the

bark is directly proportional to the intensity of the fluorine-containing emission. Our experiments make it possible to apply this method of detecting fluorine now in conjunction with other methods in diagnosing smoke damage.

Literaturverzeichnis

Bredemann, G., 1956: Biochemie und Physiologie des Fluors.

— —, und H. Radeloff, 1937: Über Fluor-Rauchschäden. Fluoraufnahme durch die Rinde der Sprosse und ihre Wirkung. Angew. Bot. **19**, 172—181.

Nommik, H., 1953: Fluorine in Swedish agricultural products, soil and drinking water. Chemistry including Metallurgy Series **3**, Nr. 7.

Scharrer, K., 1941 u. 1944: Biochemie der Spurenelemente. S. 84 und 209.

Schuch, K., 1953: Zur Methodik der Fluorbestimmung in der Holzschutzforschung. Holzforschung **7**, 18—25.

Willard, H., and O. Winter, 1933: Volumetric method for determination of fluorine. Ind. Eng. Chem., Analyt-Edit., Washington, **5**, 7—10 (die Arbeit war nur im Referat zugänglich).

Aus dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule Aachen

Direktor: Prof. Dr. A. Th. Czaja

Untersuchungen über die Entwicklung von *Exobasidium Azaleae* Peck. und seine Infektion der Wirtspflanzen unter besonderer Berücksichtigung der gallenbildenden Wirkstoffe

Von

E. Göttgens

Mit 10 Abbildungen

Inhalt: I. Einleitung. — II. Die Entwicklung von *Exobasidium* nach den bisher vorliegenden Untersuchungen. — III. Material und Methoden. — IV. Experimentelle Untersuchungen. 1. Kulturversuche mit *Exobasidium Azaleae;* Kultur auf synthetischen Nährlösungen mit Zusatz von Pflanzensäften; Kultur auf vollsynthetischen Nährlösungen; Ermittlung der optimalen Mengen von Glukose und l-Asparagin; Ermittlung der optimalen Menge an $MgSO_4$ und KH_2PO_4; Erhöhung des Gehaltes an l-Asparagin; Bestimmung der Wachstumszeit des Pilzes in einer optimalen Nährlösung; Kulturversuche mit größeren Mengen von Nährlösung und stärker konzentrierten Nährlösungen; Kulturversuche mit anderen Stickstoffquellen; Nährlösung mit Saccharose und l-Asparagin; Nährlösungen mit Zusätzen von Pflanzensäften und Vitaminen; Ermittlung der Virulenz einer Pilzkultur auf einer optimalen Nährlösung; Die Wachstumsweise des Pilzes in der Kultur. 2. Infektionsversuche mit *Exobasidium Azaleae* an *Azalea indica*; Infektionen mit Gallensporen; Infektionen mit Kultursporen; Infektionsverlauf, Gallenbildung und Überwinterung von *Exobasidium Azaleae.* 3. Prüfung auf Wuchsstoffe; Der Bohnentest; Der Hafertest; Gewebekulturversuche; Versuche zum papierchromatographischen Nachweis der Wirkstoffe; Mikrobiologischer Nachweis der Wirkstoffe. — V. Besprechung der Untersuchungen. — Zusammenfassung. — Summary. — Literaturverzeichnis.

I. EINLEITUNG

Die Arten der Pilzgattung *Exobasidium* rufen an den Wirtspflanzen gallenartige Anschwellungen der Stengel oder etwa kugelförmige Gallen an den Blättern hervor.

In unseren Gebieten sind von *Exobasidium* Woronin besonders bekannt: *Exobasidium Azaleae* Peck. Synon. *Exobas. japonicum* Shir., *Exobasidium rhododendri* Cram. und *Exobasidium vaccinii* (Fuck.) Woronin.

Unter dem Einfluß des im Gewebe der Wirtspflanzen sich entwickelnden Pilzes — die Hyphen verlaufen in den Interzellularen, von denen aus Haustorien in die Zellen vorgetrieben werden — beginnt das Parenchym durch

lebhafte Zellteilungen anzuschwellen bzw. besondere Gewebekörper (Gallen) zu bilden.

An der Oberfläche dieser Wucherungen bildet der Pilz Basidien und Basidiosporen. Die Basidien brechen aus den Geweben hervor und bilden einen weißlich mehligen Überzug, ein Charakteristikum der ganzen Familie.

Exobasidium Azaleae auf *Azalea indica* L. tritt in gärtnerischen Kulturen häufig auf und besitzt daher außer dem theoretischen auch wirtschaftliches Interesse.

Durch die parasitische Lebensweise, besonders durch die starke Deformation der Gewebe, bieten die Exobasidien interessante Probleme, besonders im Hinblick auf die chemische Beeinflussung der Wirtspflanze. Ferner sind auch Fragen der Infektion, Entwicklung, Kultur, Überwinterung und Bekämpfung bzw. Vermeidung der Übertragung in Azaleenkulturen von Interesse und Wichtigkeit, besonders auch bei Einfuhren aus dem Auslande.

Da in der Literatur nur wenig über die Physiologie der Exobasidien enthalten ist, wurden in größerem Umfange Untersuchungen angestellt, besonders mit dem leicht zugänglichen *Exobasidium Azaleae*.

II. DIE ENTWICKLUNG VON *EXOBASIDIUM*

Die ersten Untersuchungen des Parasiten wurden von Fuckel (1861) ausgeführt, der ihn *Fusidium* nannte. Woronin (1867) hat den Pilz als Basidiomyceten erkannt und ihn in Analogie zu *Exoascus* als *Exobasidium* bezeichnet. Die zuerst untersuchte Art wurde als Parasit auf der Preiselbeere als *Exobasidium vaccinii* (Fuck.) Woronin bezeichnet. Woronin fand in den Interzellularen des Gallengewebes ein feines Myzel, welches in der Nähe der Epidermis besonders dicht entwickelt ist, die Kutikula durchbricht und auf der Oberfläche der Gallen Basidien mit meist vier Basidiosporen bildet.

Woronin befaßte sich auch mit der Keimung der Basidiosporen und der Infektion von jungen Preiselbeerblättern. Er fand, daß die Basidiosporen vor allem in feuchter Luft sowohl auf Gallen wie auf Objektträgern auskeimen, indem sie an beiden Enden Keimschläuche bilden. Diese zerfallen aber bald zu einzelligen Konidien. Auf jungen Preiselbeerblättern zerfielen die Keimschläuche nicht immer, sondern drangen teilweise durch die Spaltöffnungen oder durch Kutikula und Epidermis in das Blattinnere ein, bildeten in den Interzellularen ein Myzel und nach 2 bis 3 Wochen wieder neue Gallen. Fraglich blieb noch die Überwinterung des Pilzes.

Brefeld (1889) kultivierte *Exobasidium vaccinii* auf leider nicht näher beschriebenen Nährlösungen und erhielt untergetaucht Myzelfäden, an der Luft Konidien. Es gelang ihm, mit den auf Nährlösungen erhaltenen Konidiosporen an Preiselbeerblättern Gallen zu erzeugen.

Laubert (1932) scheint sich nur auf die Beobachtungen von Woronin und Brefeld zu stützen. Er erwähnt auch *Exobasidium japonicum* Shir., welches seit dem Jahre 1908 in Deutschland beobachtet wurde.

Nachdem sich einige weitere Autoren mit verschiedenen anderen *Exobasidium*-Arten beschäftigt hatten, kultivierte Graafland (1953) u. a. auch

Exobasidium japonicum Shir. auf verschiedenen — leider schlecht definierten — Nährlösungen. 1957 befaßte er sich mit der Verbreitung, Infektion und Bekämpfung von *Exobasidium japonicum* Shir. auf verschiedenen Azaleenrassen. Mit den auf Nährlösungen erhaltenen „Blastosporen" führte er erfolgreiche Infektionen durch, und nach 3 bis 4 Wochen erhielt er Gallen.

III. MATERIAL UND METHODEN

Als Versuchspflanze diente *Azalea indica* L. Sorte Hexe, welche besonders leicht von *Exobasidium Azaleae* Peck. befallen wird. Die Versuchspflanzen stammten zum Teil aus belgischen Importen, zum Teil wurden sie als zweijährige Jungpflanzen in einer örtlichen Anzuchtgärtnerei erworben.

Der zu den Untersuchungen verwendete *Exobasidium*-Stamm wurde von zwei Azaleen aus belgischen Importen (*Azalea indica* L. Sorte Hexe) mit einer größeren Anzahl von *Exobasidium*gallen isoliert. Die zum Bohnentest nach WEHNELT benutzten Bohnen wurden von der Asgrow Export Corporation in großzügiger Weise zur Verfügung gestellt. Die Karotten für die Gewebekulturen wurden im Versuchsgarten des Botanischen Instituts herangezogen.

Die Prüfung der Kulturfiltrate auf Wirkstoffe wurde mittels Testorganismen und den entsprechenden Kulturmedien durchgeführt, bezogen von der American Type Culture Collection (ATCC) bzw. den Difco Laboratories inc. Detroit in Michigan, USA.

Die benutzten Chemikalien waren p. A.-Substanzen der Firmen Merck, Riedel de Haen und Dr. Th. Schuchardt.

IV. EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN

1. Kulturversuche mit *Exobasidium Azaleae*

Kultur auf synthetischen Nährlösungen mit Zusatz von Pflanzenpreßsäften

Schon WORONIN (1867) erwähnt in seiner Arbeit über *Exobasidium vaccinii*, daß die Sporen auf feuchten Objektträgern nach mehreren Tagen sprossen. BREFELD erzielte Keimungen auf verschiedenen Nährlösungen; da er jedoch keine Angaben über die Art der verwendeten Nährlösungen macht, kann man nur auf die von ihm empfohlenen wie Malzwürze, Pflaumendekokt und Mistdekokt zurückgreifen. Da eine vollsynthetische Nährlösung erstrebt wurde, mußten entsprechende Versuche unternommen werden.

Die ersten Kulturversuche wurden im Hänge-Tropfen durchgeführt und a) 2 % Malzextrakt in Leitungswasser, b) wie a) plus 0,2 % KH_2PO_4, $MgSO_4$ und KNO_3 und c) wie b) mit 20 % Tomatenpreßsaft verwandt.

Auf in Alkohol gereinigte Deckgläser wurden in einen Tropfen sterilisierter Nährlösung Sporen von einer frischen Galle übertragen. Bei diesem Sporenmaterial handelte es sich um ein Gemisch von Basidiosporen und Sproßsporen (Abb. 1). Schon nach 24 Stunden zeigten die Kulturen deutliches Wachstum, indem Basidiosporen und Sproßsporen zu Myzelfäden

auskeimten, welche alsbald wieder in Teilstücke zerfielen und auf diese Weise neue Sproßsporen (nach BREFELD Konidien, nach GRAAFLAND Blastosporen) bildeten. Nach 2 bis 3 Tagen zeigten die Kulturen mit Leitungswasser nur geringes Wachstum, die Kulturen mit Tomatenpreßsaft eine so starke Sprossung, daß schon makroskopisch eine weißgraue Pilzmasse zu erkennen war (Abb. 2).

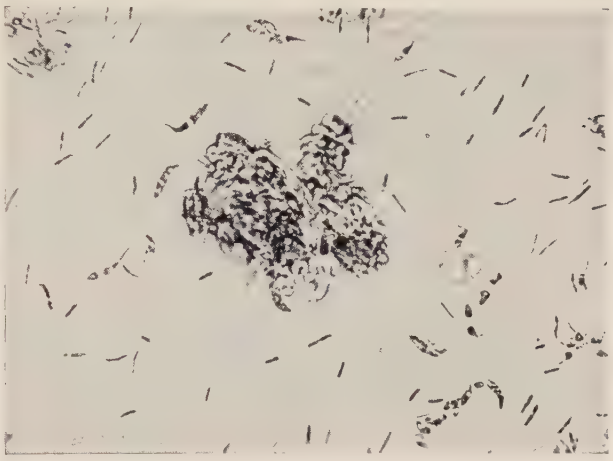

Abb. 1. „Gallensporen", Gemisch von Basidiosporen und Sproßsporen (Vergr. 300 : 1)

Nun wurden Kulturen mit größeren Mengen Nährlösung in 100-ccm-Erlenmeyerkolben angesetzt und mit jeweils 10 ccm Nährlösung beschickt. In den oben aufgeführten Nährlösungen war die Entwicklung des Pilzes bei Zusatz von Tomatenpreßsaft am besten. Nach 10 bis 15 Tagen hatte sich auf der Nährlösung eine zusammenhängende Pilzdecke und nach weiteren 10 Tagen eine kuchenartige, gewölbte Masse gebildet.

Herstellung absoluter Reinkulturen

Da die von der Galle entnommenen Sporen häufig Verunreinigungen von Bakterien und Schimmelpilzen aufwiesen, mußten zur Beimpfung der Versuchskulturen absolute Reinkulturen hergestellt werden. Daher wurden Hängetropfen einer guten Nährlösung mit möglichst wenig Sporenmaterial beimpft und nach 24 bzw. 48 Stunden Kulturdauer auf Fremdinfektionen geprüft. In Abständen von 2 bis 3 Monaten wurden neue Sporenisolierungen durchgeführt, wobei dann Stammkulturen verschiedenen Alters erhalten wurden; diese wurden im Abstand von 30 Tagen auf neue Nährlösung übergeimpft.

Abb. 2. Vier Tage alte Kultur auf Nährlösung XI im Hängetropfen (beimpft mit Gallensporen) (Vergr. 300 : 1)

Wiesen die Stammkulturen Bakterienbefall oder Verdacht auf Verunreinigungen auf, so wurden von denselben Ausstriche auf einem Pepton-Fleischextrakt-Agar mit folgender Zusammensetzung hergestellt:

2,0 % Glyzerin	0,2 % NaCl
1,2 % Pepton Witte	2,0 % Agar
0,8 % Fleischextrakt Liebig	

pH 6 bis 6,5 eingestellt mit NaOH oder H_2SO_4 Nährlösung I

Schon nach 24 Stunden zeigten die Ausstriche der verunreinigten Kulturen Bakterienkolonien, während auch die *Exobasidium*-Sproßsporen zu wachsen begannen. Durch Abimpfen von den gekeimten Sproßsporen konnten absolute Reinkulturen hergestellt werden.

Mit der Nährlösung II wurden mehrere Kulturreihen hergestellt.

2,0 % Malzextrakt	0,2 % $MgSO_4$	mit 10 bis 100 %	
0,2 % KH_2PO_4	0,2 % KNO_3	Tomatenpreßsaft	Nährlösung II

Orangenpreßsaft zeigte ähnlich gute Ergebnisse. Bei Zusatz von 10 % Preßsaft setzte die Pilzdeckenbildung auf der Nährlösung früher ein als mit größeren Mengen, während nach Beendigung des Wachstums aller Kulturen in den fruchtsaftreicheren bedeutend mehr Pilzmasse gebildet worden war als in den anderen. Da bei Verwendung von größeren Mengen Nährlösung im 100-ccm-Erlenmeyerkölbchen das Pilzwachstum langsamer vor sich ging, wurden für die weiteren Versuche stets 10 ccm Nährlösung verwandt und mit einer Platinöse Sporen beimpft. Bei der Verwendung von Sporensuspensionen — es wurden 10 Platinösen Sporen mit 10 ccm Wasser gut geschüttelt und je 10 ccm Kultur 1 ccm Suspension zugesetzt — wurden auch keine anderen Ergebnisse erzielt, so daß weiterhin keine Suspensionen zur Verwendung kamen. Um ein gleichmäßiges Pilzwachstum zu erzielen, wurden die Kulturen im Thermostaten bei einer konstanten Temperatur von 26 °C bebrütet.

Kultur auf vollsynthetischen Nährlösungen

Da die Kulturflüssigkeiten in den späteren Versuchen auf den Gehalt an Wuchs- und Wirkstoffen geprüft werden sollten, mußte eine möglichst einfache Nährlösung zusammengestellt werden, auf welcher der Pilz optimales Wachstum zeigte. Hierbei sollte der Pilz in kurzer Zeit möglichst viel Sproßsporenmyzel bilden, nach Beendigung der Wachstumszeit die dargebotenen Nährstoffe verbraucht haben und möglichst nur die Stoffwechselprodukte in der Kulturflüssigkeit zurücklassen.

Nun wurde versucht, an Hand von Analysen von Tomaten- und Orangensaft eine Nährlösung zusammenzustellen. Die anfängliche, empirische Nährlösung enthielt u. a. Zitronensäure, Ascorbinsäure, verschiedene Aminosäuren wie l-Asparagin, dl-Glutaminsäure, Leucin, Glykokoll usw., verschie-

dene Zucker wie Glukose, Fruktose und Saccharose, Vitamine und als Nährsalze $MgSO_4$, KH_2PO_4, $Ca(NO_3)_2$ und $FeSO_4$. Nach einigen Versuchen zeigte sich, daß der Pilz auf einer Nährlösung mit einem Zucker, einer Aminosäure und den Salzen KH_2PO_4 und $MgSO_4$ kultiviert werden konnte und sehr gute Myzelbildung zeigte. Wurde einer der 4 Bestandteile fortgelassen, trat Wachstumsstillstand ein. Mit anorganischem Stickstoff wuchs der Pilz nur schwach. Diese Nährlösung III hatte folgende Zusammenstellung:

0,2 % KH_2PO_4	6,0 % Glukose	
0,2 % $MgSO_4$	0,5 % l-Asparagin	Nährlösung III

10 ccm dieser Nährlösung im 100-ccm-Erlenmeyerkolben mit einer Platinöse Sporenmaterial beimpft zeigten nach 6 bis 8 Tagen Beginn der Pilzdeckenbildung; nach 15 bis 20 Tagen war die Flüssigkeit mit einer dicken Haut aus Sproßsporenmyzel überzogen.

Zur Ermittlung der optimalen Mengen der einzelnen Bestandteile wurde das Myzeltrockengewicht bestimmt und die Myzelgewichte verglichen. Die jeweils gebildete Myzelmenge wurde in einem 1 G 4 Glas-Filtertiegel abgesaugt, 2 Stunden im Trockenschrank bei 100 °C getrocknet und gewogen. Die Bestimmung des Myzelgewichtes erfolgte anfangs nach 40 Tagen, später nach der entsprechenden Wachstumszeit. Die Bestimmung des pH-Wertes erfolgte mit pH-Papier von Riedel de Haen.

Ermittlung der optimalen Mengen an Glukose und l-Asparagin

Die für die optimale Nährlösung erforderlichen Mengen an Glukose und l-Asparagin mußten aufeinander abgestimmt werden, so daß diese beiden Bestandteile so vollständig wie möglich verbraucht wurden. Daher wurden mehrere Versuchsreihen mit gleichem l-Asparagingehalt, aber steigendem Glukosegehalt angesetzt, damit nach Verbrauch des l-Asparagins bzw. des darin enthaltenen Stickstoffs die Myzelmenge trotz überschüssigen Zuckers nicht mehr zunehmen konnte. Der Restzuckergehalt wurde nach 40 Tagen gravimetrisch mit FEHLINGscher Lösung ermittelt. Durch Blindversuche wurde festgestellt, daß die Kulturflüssigkeit keine diese Reaktion störenden Substanzen enthielt und somit der Restzucker auf diese Weise erfaßt werden konnte. Die in Tabelle 1 aufgeführte Versuchsreihe enthielt von 2 bis 12 % Glukose (Nährlösung IV).

0,2 % KH_2PO_4	0,1 % l-Asparagin	
0,2 % $MgSO_4$	2 bis 12 % Glukose	Nährlösung IV

Die Myzelgewichtsbestimmung bzw. Restzuckerbestimmung erfolgte nach 40 Tagen Kulturdauer bei 26 °C; für jede Konzentration wurden jeweils 3 Versuchskulturen mit je 10 ccm Nährlösung in 100-ccm-Erlenmeyerkolben angesetzt.

Die Trockengewichtsmenge des Myzels stieg bis zu einem Glukosegehalt von 8 % an, erfuhr aber keine weitere Erhöhung mehr, selbst nicht bei weiterem Zusatz von 4 % Glukose. Die Kulturen mit 8 % Glukose wiesen schon

Tabelle 1

Glukose %	Myzelgewicht mg	Restzucker mg	pH-Wert	
			Anfang	Ende
2	35	—	4,5	6,0
2	18	—	—	6,0
2	27	—	—	6,0
4	56	—	—	4,5
4	52	—	—	4,5
4	60	—	—	4,5
6	74	—	—	4,2
6	78	—	—	4,3
6	85	—	—	4,3
8	140	31	—	4,0
8	139	60	—	3,9
8	115	84	—	4,0
10	118	360	—	3,9
10	108	325	—	4,0
10	122	310	—	3,8
12	105	420	—	3,9
12	110	460	—	3,8
12	120	487	—	3,9

geringe Restzuckermengen auf, welche mit steigendem Zuckergehalt noch zunahmen. Der Anfangs-pH-Wert von 4,5 verschob sich mit l-Asparaginüberschuß (2 % Glukose) nach pH 6,0, während bei den Kulturen mit optimaler und überschüssiger Glukose ein Endwert von pH 4,0 bis 3,8 gemessen wurde. Somit war es also möglich, die bei 0,1 % l-Asparagin vom Pilz verwertbare Glukosemenge mit 8 % festzulegen durch das Auftreten eines Restzuckers, durch das konstante Myzelgewicht und in etwa durch die pH-Wert-Bestimmung.

Um noch genauere Werte zu erhalten, wurde eine zweite Versuchsreihe mit Nährlösung IV mit einem Glukosegehalt zwischen 6 und 8 % und einer stufenweisen Erhöhung von 0,2 % angesetzt. Die entsprechenden Werte wurden wiederum nach 40 Tagen bestimmt und ergaben 7 % verwertbare Glukose.

Bestimmung der optimalen Menge an $MgSO_4$ und KH_2PO_4

In der folgenden Versuchsreihe sollte die optimale Menge an $MgSO_4$ und KH_2PO_4 ermittelt werden. Gleichzeitig sollte geprüft werden, ob bei überschüssigem Zucker das l-Asparagin und nicht etwa ein Mangel an den beiden Salzen tatsächlich den begrenzenden Faktor für die Myzelgewichtsmenge darstellt. Der Gehalt an KH_2PO_4 und $MgSO_4$ wurde gleichzeitig verändert. Die Nährlösung V bestand aus einer Grundlösung, bei welcher KH_2PO_4 und $MgSO_4$ von 0,2 bis 0,001 % vermindert wurden.

7 % Glukose	KH_2PO_4 und $MgSO_4$	
0,1 % l-Asparagin	je 0,2 bis 0,001 %	Nährlösung V

Tabelle 2

$MgSO_4$ und KH_2PO_4 %	Versuchsreihe I		Versuchsreihe II	
	Myzeltrockengewicht mg	Restzucker mg	Myzeltrockengewicht mg	Restzucker mg
0,2	116	—	123	—
0,2	114	—	115	—
0.2	118	—	120	—
0,1	102	—	104	—
0,1	106	—	93	—
0,1	110	—	110	—
0,05	106	—	91	63
0,05	90	—	108	—
0,05	113	—	126	
0,01	102	—	105	115
0,01	100	—	110	120
0,01	90	25	110	150
0,005	56	230	84	135
0,005	70	175	90	150
0,005	61	200	94	145
0,001	25	350	36	230
0,001	24	370	82	70
0,001	19	300	109	75

Da die Bestimmungen, welche nach 40 Tagen Kulturdauer erfolgten, bei verschiedenen Versuchsreihen unterschiedliche Ergebnisse zeigten, sind in Tabelle 2 zwei verschiedene Versuchsreihen aufgeführt. Während die erste Versuchsreihe bei 0,001 % Salzen nur 19 bis 25 mg Trockengewicht erreichte, waren es in der zweiten 36 bis 109 mg; jedoch zeigten beide gleichmäßig mit fallendem Salzgehalt auch fallendes Myzelgewicht, aber zum Teil sogar steigende Restzuckermengen. Aus der Tabelle geht hervor, daß 0,2 % Salze nicht begrenzender Faktor für das Myzelgewicht in Tabelle 1 sind, da mit 0,01 % Salzen noch Myzelgewichte von 110 mg erreicht wurden. Es war jedoch nicht möglich, einen optimalen Salzgehalt festzulegen, da die Ergebnisse bei Mengen unter 0,01 % zu sehr schwankten. Die weiteren Versuche wurden daher mit 0,2 % Salzen angestellt. Sollten sich diese bei der späteren Verwendung ungünstig auswirken, dann könnte nach obigen Ergebnissen auf 0,01 % heruntergegangen werden, ohne das Myzelgewicht wesentlich zu beeinflussen und größere Restzuckermengen in der Kulturflüssigkeit zu belassen.

Erhöhung des Gehaltes an l-Asparagin

In einer Versuchsreihe mit Nährlösung VI wurde der Gehalt an l-Asparagin erhöht, während Glukose- und Salzgehalt konstant blieben.

0,2 % KH_2PO_4 7 % Glukose
0,2 % $MgSO_4$ 0,1 bis 0,5 % l-Asparagin Nährlösung VI

Nach Tabelle 3 ergaben sich selbst bei Verwendung der fünffachen Menge l-Asparagin keine deutlich höheren Myzelgewichte nach 40 Tagen Kulturdauer. Somit war bewiesen, daß 0,1 % l-Asparagin und 7 % Glukose etwa das optimale Mengenverhältnis von Aminosäure und Kohlenhydrat darstellt. In Kulturen mit 0,5 % l-Asparagin lag der pH-Endwert bei 6,5. Vermutlich wurde das überschüssige l-Asparagin vom Pilz gespalten, der darin enthaltene Kohlenstoff verbraucht und die fast neutrale Reaktion durch die hierbei entstehenden Spaltprodukte bedingt.

Tabelle 3

l-Asparagin %	Myzelgewicht mg	Restzucker mg	pH-Werte	
			Anfang	Ende
0,1	116	—	4,5	3,9
0,1	114	—	4,5	3,9
0,1	118	—	4,5	3,9
0,2	112	—	4,5	5,5
0,2	118	—	4,5	5,5
0,2	126	—	4,5	5,5
0,5	140	—	4,5	6,5
0,5	120	—	4,5	6,5
0,5	129	—	4,5	6,5

Bestimmung der Wachstumszeit des Pilzes in einer optimalen Nährlösung

Um festzustellen, in wieviel Tagen der Pilz die optimalen Mengen an l-Asparagin und Glukose verbraucht, wurden von einer Kulturserie mit Nährlösung VII im Abstand von 5 Tagen von jeweils 3 Kulturen Myzeltrockengewicht, Restzuckermenge und pH-Wert bestimmt.

Wiederum wurden 10 ccm Nährlösung mit einer Platinöse Sporen beimpft und bei 26 °C kultiviert.

0,2 % KH_2PO_4 7 % Glukose pH 4,5
0,2 % $MgSO_4$ 0,1 % l-Asparagin Nährlösung VII

Nach Tabelle 4 blieb das Myzelgewicht nach 25 Tagen Kulturdauer konstant. Jedoch war noch eine Restzuckermenge von rund 100 mg vorhanden. Diese wurde nach weiteren 10 Tagen verbraucht, vergrößerte aber die Myzelgewichtsmenge nicht mehr. Demnach wurde die Glukose also nicht nur zum Aufbau des Myzels, sondern auch für den Erhaltungsstoffwechsel (Atmung) verbraucht. Die zur Verwertung von 0,1 % l-Asparagin erforderliche Glukosemenge betrug nur rund 6 %.

Eine Versuchsreihe mit 10 % Glukose und 0,1 % l-Asparagin zeigte entsprechende Ergebnisse. Mit jeweils 0,01 % Salzen wurde die gleiche

Tabelle 4

Bestimmt nach Tagen Kulturdauer	Myzelgewicht mg	Restzucker mg	pH-Endwert
10	46	400	4,5
10	43	450	4,5
10	50	430	4,5
15	88	345	4,5
15	80	313	4,5
15	82	300	4,5
20	100	195	4,2
20	105	230	4,2
20	95	225	4,2
25	114	156	4,0
25	111	152	4,0
25	118	78	3,5
30	133	40	3,5
30	122	30	3,7
30	111	70	3,5
35	124	—	3,5
35	132	—	3,5
35	115	—	3,5
40	118	—	3,5
40	114	—	3,5
40	120	—	3,8
45	112	—	3,5
45	113	—	3,8
45	114	—	3,3
50	100	—	3,5
50	112	—	3,5
50	111	—	3,5

Wachstumszeit ermittelt; jedoch lagen hierbei die Myzelgewichte etwas tiefer, und die Restzuckermenge wurde langsamer verbraucht.

Trotz sorgfältigen Arbeitens unterliegen die Werte des Myzelgewichtes, des Restzuckers und auch die pH-Endwerte gewissen Schwankungen. Somit konnten auch nur annähernd genaue Werte für die mit 0,1 % l-Asparagin verwertbare Glukosemenge festgelegt werden. Bei den weiteren Versuchen wurde neben 0,2 % Salzen 7 % Glukose beibehalten. Die überschüssige Glukose wurde vom Pilz verbraucht. Auf diese Weise wurden rückstandlose Kulturflüssigkeiten erzielt. Außerdem erschien für die weitere Verwendung der Kulturflüssigkeit ein geringer Glukoseüberschuß günstiger als ein solcher an l-Asparagin. Bei Verwendung von 0,01 % Salzen wurde wegen des langsameren Verbrauches des Restzuckers nur 6 % Glukose gegeben.

Kulturversuche mit größeren Mengen und stärker konzentrierten Nährlösungen

Zur Erzielung größerer Mengen Sproßsporenmyzel und gehaltreicherer Kulturflüssigkeiten wurden Versuchsreihen mit größeren Mengen an Nährlösung und weitere mit konzentrierteren Nährlösungen und gleichzeitig größeren Nährlösungsmengen angesetzt. Bei Verwendung von 20 und 30 ccm Nährlösung VII in 100-ccm-Erlenmeyerkolben waren die Myzelmengen prozentual denjenigen von 10 ccm Nährlösung VII gleich. Bei Verdoppelung der Konzentration derselben (Nährlösung VIII) wurde die Ausbeute an Trockenmyzel bei Verwendung von 10, 20 und 30 ccm etwas geringer als bei einfach konzentrierter Nährlösung. Die Wachstumszeit in 30 ccm Nährlösung VIII betrug 35 Tage und war somit 10 Tage länger als bei 10 ccm einfach konzentrierter Nährlösung VII.

0,4 % KH_2PO_4	14 % Glukose		
0,4 % $MgSO_4$	0,2 % l-Asparagin		Nährlösung VIII

Pilzkulturversuche mit anderen Stickstoffquellen

Es wurden auch Versuche mit dl-Alanin, dl-Glutaminsäure, l-Glutaminsäure, Glykokoll und Leucin ausgeführt. Von diesen Aminosäuren ergab dl-Glutaminsäure makroskopisch ein gutes und sogar schnelleres Wachstum des Pilzmyzels als mit l-Asparagin. Das Myzel war weiß und die Kulturflüssigkeiten hellgelbweiß. Auch mit dieser Aminosäure wurde eine optimale Zusammensetzung der Nährlösung ermittelt. Die Nährlösung IX mit 0,1 % dl-Glutaminsäure ergab nach 40 Tagen Myzelgewichte von rund 60 mg bei Verwendung von 10 g Nährlösung im 100-ccm-Erlenmeyerkolben. Bei Verdoppelung der Glutaminsäure auf 0,2 % wurden Myzeltrockengewichte von 120 mg erhalten (Nährlösung X).

0,2 % KH_2PO_4	7 % Glukose	pH 3,8	
0,2 % $MgSO_4$	0,1 % dl-Glutaminsäure		Nährlösung IX
0,2 % KH_2PO_4	7 % Glukose	pH 3,8	
0,2 % $MgSO_4$	0,2 % dl-Glutaminsäure		Nährlösung X

Die Wachstumszeit des Pilzes auf Nährlösung X betrug 20 Tage. Gleichzeitig wurde ein Glukoseverbrauch von 4 bis 4,5 % ermittelt. Mit 0,01 % Salzen wurden die gleichen Beobachtungen gemacht wie mit l-Asparagin. Bei Nährlösung XI wurde dementsprechend der Glukosegehalt auf 5 % herabgesetzt.

0,2 % KH_2PO_4	5 % Glukose	pH 3,8	
0,2 % $MgSO_4$	0,2 % dl-Glutaminsäure		Nährlösung XI

Mit dl-Alanin und Glykokoll wurde ebenfalls je eine Versuchsreihe mit steigendem Glukosegehalt von 2, 4, 6, 8 und 10 % Glukose geprüft. Zur Verwendung gelangten außerdem 0,1 % dl-Alanin bzw. 0,1 % Glykokoll und je 0,01 % Salze. Nach 40 Tagen betrug das Myzelgewicht für dl-Alanin bei

einem optimalen Glukoseverbrauch von rund 5 % 85 mg und für Glykokoll von 8 % rund 120 mg. Myzel und Kulturflüssigkeit waren bei dl-Alanin braun bis dunkelbraun, bei Glykokoll hellgelb gefärbt.

Nährlösung mit Saccharose und l-Asparagin

Wurde statt Glukose Saccharose benutzt, so wurde ebenfalls gute Myzelbildung erzielt. Vor allem blieben die Kulturen weiß bis weißgelb, und die häufig auftretende Braunfärbung bei Glukose/l-Asparagin trat nicht auf. Die Bestimmung von Restzucker und Wachstumszeit wurde mit dieser Nährlösung nicht durchgeführt. Durch Myzelgewichtsbestimmung nach 40 Tagen Kulturdauer wurde als optimal die Nährlösung XII ermittelt, welche unter den üblichen Bedingungen 140 mg ergab.

0,2 % KH_2PO_4	5 % Saccharose	pH 4,7	
0,2 % $MgSO_4$	0,2 % l-Asparagin		Nährlösung XII

Nährlösungen mit Zusätzen von Pflanzensäften und Vitaminen

Zu den optimalen Nährlösungen VII und XI wurden Preßsäfte und Vitamine gegeben. Es sollte geprüft werden, ob sich die Myzelmenge auf diese Weise erhöhen oder die Wachstumszeit verkürzen läßt und ob die hierbei erhaltenen Kulturflüssigkeiten den fraglichen Wirkstoff in größerer Menge enthielten. Bei Zusatz von 10 und 20 % Tomatensaft waren nur geringe Erhöhungen des Myzelgewichts festzustellen. Eine Verringerung der Wachstumszeit trat nicht ein. Es wurden Vitamin B_1, B_2, C und Nikotinsäureamid in verschiedenen Konzentrationen (0,1 bis 100 γ %) zugesetzt, jedoch eher eine hemmende als fördernde Wirkung erzielt.

Ermittlung der Virulenz einer Pilzkultur auf optimaler Nährlösung

Die optimalen Mengen an Stickstoff und Kohlenstoff wurden in 20 bis 25 Tagen verbraucht. Hieraus ergab sich die Frage, ob nach Beendigung der Wachstumszeit bzw. spätestens nach Verbrauch des Restzuckers die Virulenz der Sproßsporen schon bald nachließ oder noch längere Zeit erhalten blieb. So wäre es möglich, festzustellen, in welchem Zeitabstand die Stammkulturen auf neue Nährlösungen übergeimpft werden müßten. Außerdem könnte man unter der Voraussetzung, daß die noch überimpfbaren Sproßsporen an jungen Azaleenblättchen auch noch Gallen erzeugen könnten, gewisse Rückschlüsse auf die Virulenz nicht ausgetrockneter Gallensporen, d. h. auf der Galle entstandener Konidien, ziehen.

Zu diesen Versuchen wurden 20 ccm Nährlösung in 100-ccm-Erlenmeyerkolben (Nährlösung VII und XI mit und ohne Zusatz von Fruchtsäften und Vitaminen wie oben) verwendet, da 10 ccm Nährlösung meist schon nach 50 bis 70 Tagen verdunstet waren. Von dem Sproßsporenmyzel wurden nach 60, 80, 100, 120 und 140 Tagen kleinste Anteile auf 10 ccm Nährlösung XII übertragen. Aus allen Nährlösungen konnten nach 140 Tagen wieder neue Unterkulturen hergestellt werden. Nach vollständigem Verbrauch von Stick-

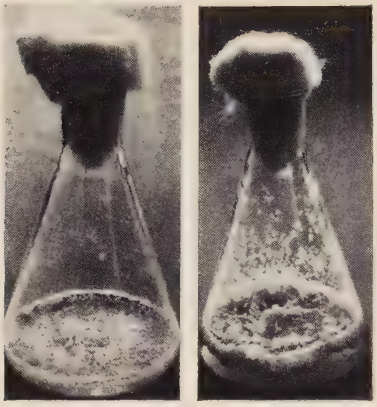

Abb. 3. Kulturen von *Exobasidium Azaleae* nach 25 Tagen Kulturdauer. Links auf 10 ccm Nährlösung VII, rechts auf 30 ccm Nährlösung VIII

stoff und Kohlenstoff blieb die Virulenz der gebildeten Pilzmasse wenigstens noch rund 100 Tage erhalten. Da die 20-ccm-Kulturen nach 140 Tagen eingetrocknet waren, konnten leider keine weiteren Überimpfungen durchgeführt werden.

Die Wachstumsweise des Pilzes in der Kultur

Die auf Nährlösungen gebildete Pilzmasse (Abb. 3) wies schon makroskopisch gewisse Unterschiede in der Form der Deckenbildung auf (Abb. 4). Unabhängig davon zeigte die Pilzmasse fortschreitenden Übergang von der extremen Sproßspore oder Konidie zum groben bis feinen Sproßmyzel (Abb. 5 bis 7). Da in gewissen Fällen sogar sehr feines Myzel (Abb. 7) gebildet wurde, konnte auf Identität des auf den Nährlösungen kultivierten Myzels mit dem Myzel der *Exobasidium*-Gallen geschlossen werden. Somit war auch zu erwarten, daß der Pilz die gleichen Wirkstoffe an das Azaleenblatt wie an die Nährlösung abgab.

Während in den ersten 15 bis 20 Tagen vornehmlich Sproßsporen gebildet wurden, fand sich in älteren Kulturen meist derbes kurzes Sproßmyzel, bisweilen auch längere dünne Myzelfäden, welche nicht mehr zerfallen konnten. Bei den Kulturen mit Tomatensaft bestand ausgesprochene Tendenz zur Bildung von Sproßsporen. Somit werden auch die Ausführungen von BREFELD über *Exobasidium vaccinii* und von GRAAFLAND über *Exobasidium japonicum*

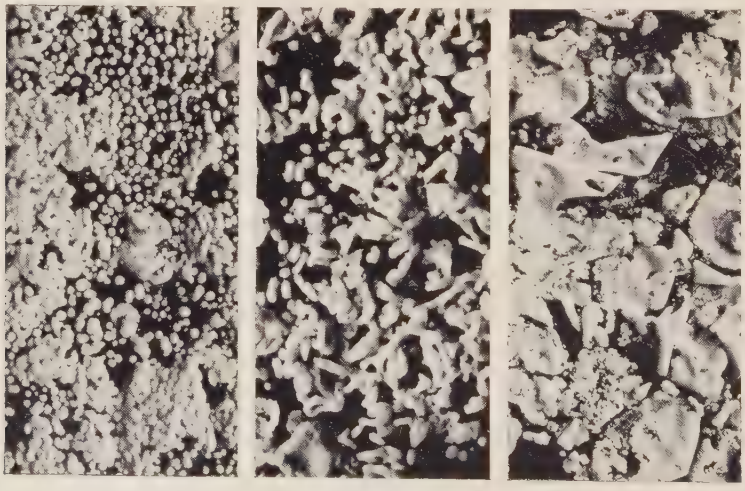

Abb. 4. Verschiedene Formen der Myzeldeckenbildung auf Nährlösung XI nach 25 Tagen Kulturdauer (Vergr. etwa 2 : 1)

verständlich, da beide auf Fruchtsäften kultivierten und Konidien erhielten. Die von Brefeld als Myzelien bezeichneten Zeichnungen besitzen im Vergleich mit den bei diesen Untersuchungen erhaltenen Myzelfäden noch aus-

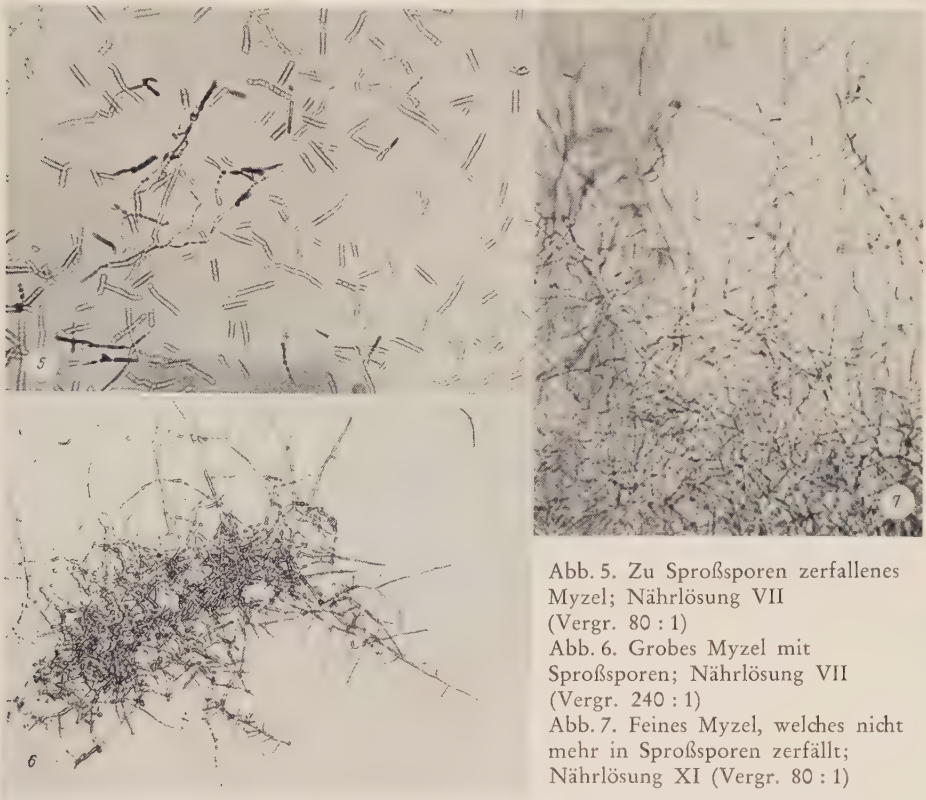

Abb. 5. Zu Sproßsporen zerfallenes Myzel; Nährlösung VII (Vergr. 80 : 1)
Abb. 6. Grobes Myzel mit Sproßsporen; Nährlösung VII (Vergr. 240 : 1)
Abb. 7. Feines Myzel, welches nicht mehr in Sproßsporen zerfällt; Nährlösung XI (Vergr. 80 : 1)

gesprochene Form von Sproßsporen. Wahrscheinlich stimmt jedoch die Beobachtung Brefelds, daß die Konidien vornehmlich in der Luft, das Myzel aber in der Flüssigkeit gebildet wird. Somit wäre dann auch das Auftreten der verschiedenen Pilzformen in der gleichen Kultur zu erklären, indem die der Nährlösung aufliegende Pilzdecke myzelförmig wächst und auf deren Oberfläche Konidien gebildet werden. Jedoch wurden auch gegenteilige Beobachtungen gemacht.

Es wurden auch Versuche unternommen, den Pilz auf den Nährlösungen zur Basidienbildung zu bringen. Alle Versuche blieben ergebnislos, obwohl den Nährlösungen eine große Anzahl verschiedener Stoffe wie Zucker, Aminosäuren, Vitamine, Wuchsstoffe (IES), Säuren und Fruchtsäfte zugesetzt wurden. Die Kulturversuche mit den genannten Nährstoffen wurden auch auf 2 % Agar unternommen, alle ohne Erfolg, obwohl der Pilz auf dem Nähragar sehr gut wächst, jedoch hauptsächlich in Form von kurzen Sproßsporen. Bedecken der sich rasch vermehrenden Sporen frischer Impfstriche mit einer dünnen Kollodiumfolie blieb auch ergebnislos.

2. Infektionsversuche mit *Exobasidium Azaleae* an *Azalea indica*

Die Basidio- und Sproßsporen werden je nach der Temperatur, bei welcher die Azaleen kultiviert werden, 5 bis 10 Tage lang auf den Gallen gebildet. Dann verwelken und vertrocknen die Gallen, und nur selten treten neue Gallen auf, sofern die Sporen nicht durch Regen oder Tau oder im Gewächshause durch Gießwasser oder durch künstliche Übertragung auf junge infizierbare Blättchen gelangen. Da für die laufenden Versuche dauernd frische Gallen und frisches Sporenmaterial notwendig waren, wurden systematische Infektionsversuche an den Pflanzen durchgeführt. Außerdem mußten die auf den verschiedenen Nährlösungen kultivierten Sproßsporen bzw. Sproßmyzelien auf ihre Infektionsfähigkeit geprüft werden.

Für diese Infektionsversuche wurden 30 zwei- bis vierjährige, aus Stecklingen herangezogene Azaleenpflanzen der Sorte Hexe benutzt, von welcher die Ausgangssporen stammten und die offensichtlich die größte Bereitwilligkeit zur Gallenbildung zeigt.

Infektionen mit Gallensporen

An den Triebspitzen wurden die meist 2 bis 3 jüngsten Blättchen, welche noch keine voll ausgebildete Kutikula besaßen, mit 2 bis 3 Tropfen Leitungswasser benetzt. Das Sporenmaterial wurde mit einer Nadel von frischen, sporenreichen Gallen in die Wassertropfen übertragen. Dieses Sporenmaterial stellte meist ein Gemisch von Basidiosporen und Sproßsporen (Abb. 1) dar. Zum leichteren Eindringen des Pilzes in das Blattinnere wurden bei weiteren Infektionsversuchen die Blättchen vorher mit einer Nadel angestochen, d. h. verletzt. Auf diese Weise wurden weit bessere Ergebnisse erzielt (Tab. 5). Die beimpften Azaleen wurden im Gewächshause bei hinreichender Luftfeuchtigkeit und 25 °C kultiviert.

Die ersten Anzeichen einer Infektion waren im günstigsten Falle nach 15 Tagen, im allgemeinen aber erst nach 20 bis 25 Tagen als Verhärtungen des Blattgewebes zu erkennen. Nach 30 bis 40 Tagen begann bei den inzwischen voll ausgebildeten Gallen die Sporenbildung. Sie dauerte durchschnittlich 5 bis 10 Tage, abhängig von Temperatur und Luftfeuchtigkeit, da die Kutikula der vergallten Blätter bei Erscheinen der Sporen emporgehoben und abgestoßen wird, die Gallen keinen Transpirationsschutz mehr besitzen und in trockener Luft auch die Sporenbildung einstellen und vertrocknen. In feucht-warmer Umgebung wurden die Gallen sehr bald von Schimmelpilzen befallen und kamen häufig noch nicht einmal zur Sporenbildung.

Die Anzahl der bei den Beimpfungen erzielten Gallen war insbesondere abhängig von der Bereitwilligkeit der verschiedenen Pflanzen, Gallen zu bilden; nach der Beimpfung von 20 Trieben mit rund 60 Blättchen bildeten manche Pflanzen 20 bis 30, andere nur 2 bis 3 oder gar keine Gallen. Weiterhin war die Gallenbildung abhängig von der Jahreszeit, in welcher die Beimpfungen durchgeführt wurden, und von der Temperatur des Kulturraumes. Die oben geschilderten Versuche wurden in den Monaten April bis Oktober bei einer Gewächshaustemperatur von 20 bis 30 °C durchgeführt.

Infektionen mit Kultursporen

Die Infektionsversuche hatten zwei Ziele:

1. Laufende Gewinnung frischer Gallen und Sporen.
2. Impfung mit Sporen aus verschiedenen Nährlösungskulturen (vollsynthetische und solche mit Zusätzen von Fruchtsäften) zur Prüfung der Sporen auf Infektionstüchtigkeit und Prüfung der Nährlösungen auf ihre Verwendbarkeit.

Auch bei den Infektionsversuchen mit Kultursporen waren Gallenbildungen zu verzeichnen (Abb. 8 und 9); die Ergebnisse mit Gallensporen waren wesentlich besser (Tab. 5 und 6).

Abb. 8. Gallenbildung nach Beimpfung mit Kultursporen
Abb. 9. Einzelne Galle aus Abbildung 8

Es wurden nur Azaleen verwendet, welche als gute Gallenbildner bekannt waren. Die mit verschiedenem Sporenmaterial beimpften Triebe mit meist 3 jungen Blättchen wurden markiert und die gebildeten Gallen nach 30 bis 40 Tagen ausgezählt.

Pflanzen Nr. I und II

Diese Pflanzen wurden mit Gallen- und Kultursporen und gleichzeitig ohne und mit vorherigem Verletzen der Blättchen geimpft. Als Impfmaterial dienten ein 3 Monate alter Stamm und 12 Tage alte Kulturen auf Nährlösung VII und XI. An beiden Pflanzen wurden die beiden Sporensorten und die zwei verschiedenen Infektionsarten an jeweils 5 Trieben mit zusammen 15 Blättchen überprüft.

Von 60 Trieben mit rund 180 beimpften Blättchen hatten 22 Triebe an 32 Blättern 39 Gallen gebildet. Die beste Gallbildung zeigten die mit Gallensporen beimpften und vorher verletzten Blättchen; auch bei der Beimpfung mit Kultursporen wirkte sich die vorherige Verletzung der Blättchen günstig aus. Die auf Nährlösung XI kultivierten Sporen zeigten bessere Gallbildung als die auf Nährlösung VII.

Tabelle 5

30 Tage nach der Beimpfung vorhandene Gallen

Anzahl der beimpften Triebe	Art der Sporen	Nr. der Nährlösung	verletzt oder nicht	Anzahl der infizierten Triebe und Blätter Anzahl der Gallen	
				Pflanze Nr. I	Pflanze Nr. II
5 Triebe	Gallensporen		angestochen	3 Triebe 4 Blätter 5 Gallen	3 Triebe 11 Blätter 12 Gallen
5 Triebe	Gallensporen		nicht angestochen	2 Triebe 2 Blätter 3 Gallen	3 Triebe 3 Blätter 3 Gallen
5 Triebe	Kultursporen	Nährlösung VII	angestochen	1 Trieb 1 Blatt 1 Galle	1 Trieb 1 Blatt 1 Galle
5 Triebe	Kultursporen	Nährlösung VII	nicht angestochen	negativ	2 Triebe 2 Blätter 2 Gallen
5 Triebe	Kultursporen	Nährlösung XI	angestochen	2 Triebe 2 Blätter 2 Gallen	2 Triebe 2 Blätter 3 Gallen
5 Triebe	Kultursporen	Nährlösung XI	nicht angestochen	1 Trieb 1 Blatt 1 Galle	2 Triebe 2 Blätter 5 Gallen

Pflanzen Nr. III und IV

An diesen Pflanzen wurde die Infektionstüchtigkeit von Gallensporen mit Kultursporen von verschiedenen Nährlösungen verglichen. Vor der Beimpfung wurden alle jungen Blättchen verletzt. Zur Verwendung gelangte wiederum der drei Monate alte Kulturstamm und Sporen aus 12 Tage alten Kulturen der Nährlösungen VII und XI, jeweils mit und ohne Zusatz von 10% Tomatensaft bzw. Vitaminen (100 γ% B_1, B_2, C und Nikotinsäureamid).

Von 70 Trieben mit 210 beimpften Blättchen zeigten nach 30 Tagen 24 Triebe an 29 Blättern 54 Gallen. Gute Gallenbildungen waren mit Gallensporen und Kultursporen von Nährlösung XI zu verzeichnen, während Zusätze von Tomatensaft und Vitaminen die Gallenbildung verringerten.

Infektionsverlauf, Gallenbildung und Überwinterung von *Exobasidium Azaleae*

Da die Gallenbildung erst 15 Tage nach der Infektion einsetzte, ergab sich die Frage, ob der Pilz tatsächlich 15 Tage zur Gallenbildung benötigte

Tabelle 6

30 Tage nach der Beimpfung vorhandene Gallen

Anzahl der beimpften Triebe	Art der Sporen	Art der Nährlösung	Anzahl der infizierten Triebe und Blätter Anzahl der Gallen	
			Pflanze Nr. III	Pflanze Nr. IV
5 Triebe	Gallensporen		3 Triebe 7 Blätter 13 Gallen	3 Triebe 3 Blätter 8 Gallen
5 Triebe	Kultursporen	Nährlösung VII	2 Triebe 2 Blätter 3 Gallen	negativ
5 Triebe	Kultursporen	Nährlösung VII mit 10 % Tomatensaft	1 Trieb 1 Blatt 4 Gallen	1 Trieb 1 Blatt 1 Galle
5 Triebe	Kultursporen	Nährlösung VII mit Vitaminzusätzen	1 Trieb 1 Blatt 1 Galle	negativ
5 Triebe	Kultursporen	Nährlösung XI	2 Triebe 3 Blätter 8 Gallen	4 Triebe 4 Blätter 8 Gallen
5 Triebe	Kultursporen	Nährlösung XI mit 10 % Tomatensaft	1 Trieb 1 Blatt 2 Gallen	3 Triebe 3 Blätter 3 Gallen
5 Triebe	Kultursporen	Nährlösung XI mit Vitaminzusätzen	1 Trieb 1 Blatt 1 Galle	2 Triebe 2 Blätter 2 Gallen

oder ob die jungen Blättchen erst nach diesem Zeitraum so weit herangewachsen waren, daß die Bildung von Gallen möglich war, d. h. erst dann dem Pilz die zur Gallenbildung erforderliche Nahrung bieten konnten. Ältere Blätter konnten niemals infiziert werden, die jungen infizierbaren Blättchen aber nahmen nach der Infektion um das 3- bis 6fache ihrer Größe zu und konnten dem Pilz nun erst wirklich genügend Ausdehnungsmöglichkeit und Nahrung bieten.

Da die Gallen im Frühjahr und Sommer oft in sehr großer Anzahl auftreten, könnte man vermuten, der Pilz bilde auch in der Wirtspflanze verbleibende Myzelien. Um dies zu überprüfen wurden 6 Versuchspflanzen, welche von April bis September durchschnittlich 15 Gallen gebildet hatten, im folgenden Sommer nicht mehr beimpft und auf etwaige Gallenbildungen beobachtet. Da nur in 2 Fällen 5 bis 6 Monate nach der letzten Gallenbildung je eine Galle auftrat, schien die Gegenwart von Myzelien in den Wirtspflanzen unwahrscheinlich, da man in diesem Falle eine ausgedehnte Gallenbildung hätte erwarten müssen.

Das massenhafte Auftreten der Gallen im Frühjahr beruht auf der Tatsache, daß der Pilz in den jungen Blättchen der Wirtspflanze überwintert und erst im Frühjahr, wenn bei den jungen Blättchen wieder Wachstum einsetzt, zur Gallenbildung schreitet. Dies konnte an folgender Versuchsreihe deutlich gezeigt werden: Zweimal 6 als gute Gallbildner bekannte Versuchspflanzen wurden am 15. Oktober an jeweils 10 Triebspitzen (= 30 Blättchen) nach vorherigem Anstechen beimpft. 6 Pflanzen blieben im Warmhause und bildeten nach 25 bis 30 Tagen jeweils 10 bis 15 Gallen. Die restlichen 6 Pflanzen wurden in einem kühlen, frostfreien Raum untergebracht, wobei zu erwarten war, daß die Gallenbildung erst nach Verbringen in einen wärmeren Raum (was nach 4 bis 6 Monaten geschehen sollte), eintreten würde. Leider erwies sich der kühle Raum nach 10 Tagen als ungeeignet. Die Pflanzen hatten das ältere Laub schon fast ganz abgeworfen, während die jungen beimpften Spitzentriebe noch verhältnismäßig frisch waren. Um die Pflanzen noch zu retten, wurden sie unter günstigen Bedingungen bei 10 bis 15 °C weiterkultiviert. Sie erholten sich nach 3 bis 4 Wochen wieder so weit, daß das Wachstum der Spitzentriebe wieder einsetzte. Gleichzeitig setzte aber auch die Gallenbildung ein, und vom 1. Januar bis 1. März wurden insgesamt 118 Gallen gezählt. Durch die zum Teil ungewollte (Verlust des Laubes) künstliche Ruhe war es also möglich geworden, die Zeitspanne von der Infektion bis zur Gallenbildung 4 bis 5 Monate hinauszuschieben. Bei der geringen Belaubung und den niedrigen Temperaturen wuchsen die jungen infizierten Blättchen nur langsam, die Gallenbildung erfolgte nur nach und nach. Dieser Versuch zeigt also, daß die Myzelien wirklich in den jungen Blättchen überwintern, wenn diese im Spätherbst ihr Wachstum einstellen und die jungen Infektionshyphen weder über ausreichenden Lebensraum noch über genügend Nährstoffe verfügen. Gleichzeitig wird aus dieser Versuchsreihe deutlich, warum im Frühjahr plötzlich sehr viele Gallen auftreten, obwohl keine Dauermyzelien in den Wirtspflanzen gebildet werden.

Die günstigste Zeit für die Infektionsversuche waren die Monate April bis Mitte Oktober. Von November bis März war es schwieriger, Gallen zu erhalten, da in diesen Monaten meist nur noch wenig infizierbare Blätter vorhanden waren und die Pflanzen zur Blütenbildung übergingen. Die im Erwerbsgartenbau gezüchteten Azaleen stehen im Sommer häufig in Freilandbeeten, so daß Regen, Nebel und Tau für die Verbreitung der Sporen genügend Gelegenheit bieten. Kommen diese Pflanzen nun im Spätherbst vor Frostbeginn zur Blütenbildung in die Häuser, dann erfolgt unter diesen günstigen Bedingungen die Gallenbildung in den jungen infizierten und sich nun streckenden Blättchen; und bei den zum Verkauf angebotenen blühenden Azaleen kann man häufig prächtige Gallen entdecken. Bei Freiland- und wild wachsenden Pflanzen (Preiselbeere mit *Exobasidium vaccinii*) dauert die Inkubationszeit entsprechend den jeweiligen klimatischen Verhältnissen länger.

3. Prüfung der Wuchsstoffe

Die bemerkenswerte Tatsache, daß der Pilz nach erfolgter Infektion das Blattgewebe zu lebhaften Teilungen anregt, so daß Gallen an den Blättern

gebildet werden, muß auf einen chemischen Einfluß des Pilzes zurückgeführt werden. Es ist bekannt, daß gewisse gallenbildende Insekten geringe Mengen β-Indolylessigsäure in die Zellen des Wirtes abgeben, während andererseits manche Pilze geringe Mengen von verschiedenartigen Wirkstoffen in ihren Kulturmedien nachweisen lassen. Es wurde nun versucht, festzustellen, ob *Exobasidium Azaleae* auch Wirkstoffe an die Azaleenblätter bzw. in die Kulturflüssigkeit abscheidet.

Der Bohnentest

Mit dem Bohnentest von Wehnelt (1927), welcher von Bonner und English (1938) verbessert wurde, wurde versucht, Traumatin oder einen Ko-Faktor des Traumatins in der Kulturflüssigkeit nachzuweisen. Die mit *Phaseolus vulgaris* „Kentucky Wunder" (braunsamige Sorte) durchgeführten Versuche verliefen negativ, so daß also weder Traumatin noch ein Ko-Faktor in der Kulturflüssigkeit nachgewiesen werden konnten. Verwendet wurde Nährlösung XI.

Der Hafertest

Der Hafertest von W. Went (1929) diente zur Prüfung der Kulturflüssigkeit von *Exobasidium Azaleae* (Nährlösung XI) auf die Gegenwart von β-Indolylessigsäure; auch diese Proben fielen negativ aus.

Gewebekulturversuche

Es wurde weiter versucht, mit Hilfe von Kulturen verschiedener pflanzlicher Gewebe die Abgabe von teilungsfördernden Substanzen durch *Exobasidium* an das Kulturmedium nachzuweisen.

Als Kulturgefäße dienten weithalsige Reagenzgläser mit einer lichten Weite von 25 mm und einer Länge von 150 mm. Die Gewebestückchen wurden nach der Methode von Heller (1949) auf Filtrierpapier kultiviert; das Papier, am besten Rundfilter, wurde über einer Matritze zu einem Tischchen geformt und so weit in das Reagenzglas hinabgedrückt, daß die unteren Spitzen in die Nährlösung tauchten. Die Kulturgläser wurden mit einem Wattestopfen verschlossen. Auf diese Weise wurden die Gewebestücke hinreichend mit Nährlösung und mit Sauerstoff versorgt. Als Grundlösung diente die Nährlösung von White (1949 a, b).

Neben einigen anderen pflanzlichen Geweben wurde besonders kambiumhaltiges Parenchymgewebe der Wurzel von *Daucus carota* verwendet, welche ein gut sterilisierbares und leicht kultivierbares Gewebe hat, und auch junge Azaleenblättchen, die bei der Gallenbildung meristematische Gewebe enthalten. Karotten (mittellange, dicke Sorte) einer einheitlichen Aussaat wurden verwendet. Die Karotten wurden gründlich gewaschen, geschält und 30 Minuten in einer 5%igen Lösung eines 10fach konzentrierten Bleichwassers (Natriumhypochlorit) sterilisiert. Nach der Sterilisation wurde die Karotte zweimal 30 Minuten in sterilisiertem Aqua dest. gewaschen und die Gewebestückchen steril entnommen. Dazu wurde die von Caplin (1952) beschriebene Röhre mit 1,8 mm Durchmesser mit passendem Ausstoßer benutzt. Alle Ge-

räte wurden zur Sterilisation 30 Minuten lang im Trockenschrank bei 180 °C erhitzt. Mit dieser Röhre wurden senkrecht zur Längsachse sterile Zylinder aus der Karotte herausgestoßen und mit dem Ausstoßer auf einen Teller gelegt. Sodann wurde mit steriler Rasierklinge das Kambiumgewebe aus den Zylindern herausgeschnitten. Diese Gewebestückchen hatten ein Durchschnittsgewicht von 3 mg. Jeder Zylinder lieferte 2 brauchbare Gewebestückchen; außer Kambium war noch etwas Xylem- und Phloemgewebe vorhanden. Die auf diese Weise isolierten Gewebestückchen wurden in einer Petrischale mit sterilisiertem Wasser gespült und dann mit abgeflammter Platinöse in die Kulturgefäße übertragen.

Die Kulturgläser wurden mit 10 ccm Nährlösung nach WHITE beschickt und im Dampftopf 20 Minuten bei 100 °C sterilisiert. Die Kultur erfolgte im Thermostaten bei 26 °C. Die Kulturflüssigkeit wurde durch einen Filtertiegel (1 G 5 F) steril filtriert und mit einer sterilisierten Meßpipette der Nährlösung nach WHITE zugesetzt. Im allgemeinen wurden 0,1 bis 1 ccm zu 10 ccm Nährlösung nach WHITE zugesetzt und der Wirkstoffgehalt der Kulturflüssigkeit durch die jeweils von 1 ccm Kulturflüssigkeit erzeugte Trockenmyzelmenge ausgedrückt und errechnet, indem von den verwendeten Kulturen die Menge der Kulturflüssigkeit und das Myzeltrockengewicht bestimmt wurden. Die zur Prüfung auf Wirkstoffe verwendeten Gewebestücke wurden nach der Isolierung 6 bis 8 Tage auf reiner Nährlösung nach WHITE vorkultiviert und dann erst auf die Nährlösungen mit Zusatz von Kulturflüssigkeit übertragen. Zur Vorkultur wurden jeweils 10 Gewebestücke in einer Röhre zusammen kultiviert, während die Hauptkulturen nur ein Gewebestück enthielten. Nach 20 bis 60 Tagen Kulturdauer wurde das Frischgewicht (Wägeglas) und in einigen Fällen nach vierstündigem Trocknen bei 90 °C das Trockengewicht bestimmt.

Kultur von 3 mg Kambiumgewebestückchen der Karotte auf Nährlösung nach WHITE mit Zusatz von *Exobasidium*-Kulturfiltrat

In Vorversuchen wurde festgestellt, daß die steril filtrierte Kulturflüssigkeit von *Exobasidium Azaleae* auf 3 mg Kambiumgewebestückchen wachstumsfördernd wirkt. Zum Nachweis, daß die wachstumsfördernde Wirkung tatsächlich von der Kulturflüssigkeit und nicht etwa schon von der Pilznährlösung ausgelöst wurde, wurden 3 verschiedene Karotten-Kulturen auf reiner Nährlösung nach WHITE, auf Nährlösung nach WHITE mit Zusatz von 1 ccm Nährlösung XI und auf Nährlösung nach WHITE mit Zusatz von 1 ccm Kulturflüssigkeit der Nährlösung XI angesetzt. Die Kulturflüssigkeit wurde nach 43 Tagen Kulturdauer verwendet; 1 ccm entsprach einem Trockenmyzelwert von 60 mg (Abb. 10). Zur Prüfung auf Hitzebeständigkeit wurde ein Teil der Kulturflüssigkeit 20 Minuten bei 100 °C im Autoklaven erhitzt und von dieser Kulturflüssigkeit ebenfalls wieder 1 ccm mit 60 mg Myzelwert zu 10 ccm Nährlösung nach WHITE zugesetzt. Das Frischgewicht der Karottenstücke wurde nach 40 Tagen bestimmt. Der Versuch wurde an 3 verschiedenen Karotten mit jeweils 3 Versuchsstückchen durchgeführt (Tab. 7).

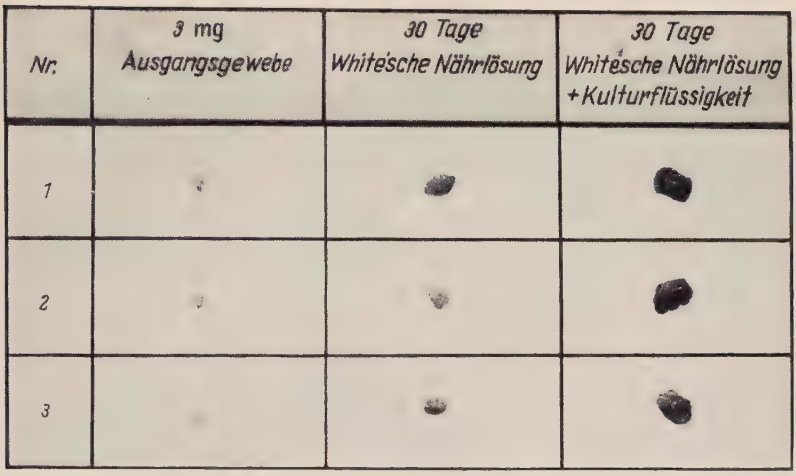

Abb. 10. Karottengewebestückchen vor und nach der Kultur mit und ohne Zusatz von Kulturfiltrat. Natürliche Größe

Tabelle 7

Karotte Nr.	Nährlösung White rein	Mittel	Nährlösung White + Kfl.	Mittel	Nährlösung White + Kfl. erhitzt	Mittel	Nährlösung White + Nährlösung XI	Mittel
1	18 15 17	16	53 40 45	46	46 44 40	43	16 13 18	15
2	15 18 20	17	30 26 31	29	26 32 31	29	12 11 12	11
3	16 21 19	18	40 35 32	35	37 38 35	36	13 16 19	16

Bei der Bestimmung des Trockengewichtes ergaben sich für die Ausgangsstückchen (3 mg) Trockengewichte im Mittel von 0,3 mg und für die kultivierten Gewebestücke (40 mg) Trockengewichte im Mittel von 6,0 mg.

Tabelle 7 zeigt, daß eine deutlich fördernde Wirkung der Kulturflüssigkeit besteht, und zwar nicht nur bei der steril filtrierten, sondern auch bei der erhitzten Kulturflüssigkeit, d. h., der fragliche Wirkstoff oder wenigstens ein Teil desselben ist hitzebeständig. Bei Zusatz von 1 ccm Nährlösung XI zu 10 ccm Nährlösung nach White war gegenüber reiner Nährlösung nach White keine fördernde Wirkung festzustellen, so daß der vergrößerte Gewebezuwachs bei den Kulturen mit Zusatz von Kulturflüssigkeit von Pilzwirkstoffen und nicht schon von der Nährlösung XI hervorgerufen wurde. Die 3 verwendeten Karotten reagierten bei Zusatz von 1 ccm Kulturflüssigkeit verschieden. Während Karotten Nr. 2 und 3 gegenüber den Kulturen auf reiner Nährlösung nach White rund 100 % Zuwachs aufwiesen, war es bei Karotte Nr. 1 200 %. Durch die Bestimmung des Trockengewichtes bei einigen Kulturen wurde der Nachweis erbracht, daß es sich bei der Zunahme des

Frischgewichtes nicht nur um eine Wasseraufnahme, sondern auch um einen wirklichen Wachstumsvorgang mit Substanzvermehrung handelte.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde gezeigt, daß die optimale Förderung der Gewebestückchen bei verschiedenen Karotten verschieden war und bei einem Zusatz von 5 bis 50 mg Myzelwert zu 10 ccm Nährlösung nach WHITE lag; das Frischgewicht nahm bis zum 60. Tage stetig zu.

Wurde 30 Tage altes Kulturfiltrat mit Äther oder Chloroform ausgeschüttelt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und den Karottenkulturen auf Nährlösung nach WHITE zugesetzt, so trat ebenfalls verstärktes Wachstum ein; somit waren also die Wirkstoffe wenigstens teilweise in Äther bzw. Chloroform löslich.

Da im hiesigen Botanischen Institut Keimungsversuche mit den Sporen vom echten Hausschwamm (*Merulius lacrymans* [Wulf.] Schum.) durchgeführt wurden und zahlreiche Kulturfiltrate von verschiedenen Schimmel- und Bläuepilzen mit und ohne weiterem Säurezusatz (Zitronensäure, Äpfelsäure usw.) keimungsauslösend auf die Sporen wirkten, lag es nahe, auch die Wirkung der Kulturflüssigkeit von *Exobasidium Azaleae* auf die Hausschwammsporen zu testen. Hierbei zeigte sich, daß die Kulturflüssigkeit mit Säurezusätzen ebenfalls keimungsauslösend wirkte. Da aber die Vitamine bzw. Wirkstoffe Vitamin B_1, Biotin, Nikotinsäure bzw. Nikotinsäureamid, Mesoinosit, Natriumpantothenat und p-Aminobenzoesäure zusammen mit Säuren auf Hausschwammsporen die gleiche Wirkung zeigten, war zu vermuten, daß von *Exobasidium* einer oder mehrere der oben aufgeführten oder wenigstens ähnliche Wirkstoffe gebildet werden (CZAJA und POMMER 1959).

Die oben aufgeführten Wirkstoffe wurden der Nährlösung nach WHITE zugesetzt und auf dieser Nährlösung Karottenstückchen kultiviert. Von jedem Wirkstoff wurden 500 γ% zugesetzt, um ein Vielfaches der in Nährlösung nach WHITE vorhandenen B_1-Menge und bei allen Wirkstoffen einheitliche Mengen anzuwenden. Von den Vitaminen und Wirkstoffen zeigten nach 40 Tagen Kulturdauer Biotin, Mesoinosit und p-Aminobenzoesäure ähnlich fördernde Wirkung wie eine Kulturflüssigkeit mit 20 mg Trockenmyzel in 1 ccm (Tab. 8).

Tabelle 8

Zusätze von Wirkstoffen	Kambiumgewebe einer Karotte nach 40 Tagen Kulturdauer in mg	Mittelwert
Nährlösung nach WHITE rein	27 20 25	24
20 mg Myzel/1 ccm Kulturfiltrat	40 50 57	49
500 γ% B_1	32 30 33	32
500 γ% Biotin	44 50 62	52
500 γ% Nikotinsäureamid	24 25 27	25
500 γ% Mesoinosit	47 40 50	46
500 γ% Natr. Pantothenat	25 30 28	28
500 γ% p-Aminobenzoesäure	40 35 30	35

Papierchromatographischer Nachweis der Wirkstoffe

Um die Wirkstoffe in den Kulturfiltraten von *Exobasidium Azaleae* genauer festlegen zu können, wurden mit den Kulturfiltraten der Nährlösung XI eingehende papierchromatographische Untersuchungen durchgeführt. Zur Verwendung gelangte die aufsteigende Methode mit Papier von Schleicher und Schüll Nr. 2043 a (nach Dr. Waldi) und Nr. 2043 b Mgl.

Zur Gewinnung von Kulturflüssigkeit wurde wiederum Nährlösung XI verwandt. Der Salzgehalt für diese Versuche wurde auf 0,01 % herabgesetzt, da Schwanzbildungen und ungenaue R_f-Werte vermieden werden sollten. Es gelangte Kulturflüssigkeit zur Verwendung, in welcher weder Aminosäuren noch Zucker papierchromatographisch, letztere auch nicht mit FEHLINGscher Lösung nachgewiesen werden konnten.

Der papierchromatographischen Prüfung wurden unterworfen: Aminosäuren, Zucker und Zuckeralkohole, nichtflüchtige wasserlösliche Säuren und Wachstumsregulatoren bzw. Wuchsstoffe. Alle Proben fielen negativ aus. Wohl gelang der Nachweis von dl-Glutaminsäure und Glukose in Kulturen, deren Nährlösung noch nicht völlig erschöpft war, d. h. vor Beendigung der Wachstumszeit. Da in Kulturflüssigkeiten (Nährlösung XI), in welchen weder papierchromatographisch noch mit FEHLINGscher Lösung Glukose nachgewiesen werden konnte, auch keine Glutaminsäure mehr vorhanden war, konnte auf diese Weise bestätigt werden, daß bei dieser optimalen Nährlösung nach Beendigung der Wachstumszeit nicht nur die Gesamtmenge an Glukose, sondern auch die dl-Glutaminsäure vollständig verbraucht war.

Es wurde weiterhin versucht, Vitamine und Wirkstoffe in den Kulturfiltraten auf den Chromatogrammen mit verschiedenen Sprühreagenzien nachzuweisen. Da so geringe Mengen an Wirkstoffen in den Kulturfiltraten zu erwarten waren, daß ein papierchromatographischer Nachweis versagte, wurden diese Versuche nicht weiter fortgesetzt. Auch zeigte sich später, daß in der Nährlösung XI selbst schon geringe Mengen an Wirkstoffen vorhanden waren und die Zunahme des Wirkstoffgehaltes im Kulturfiltrat am besten nephelometrisch bestimmt wurde.

Mikrobiologischer Nachweis der Wirkstoffe

Auf Grund der Tatsache, daß eine Reihe von Mikroorganismen auf spezifischen optimalen Nährlösungen nur in Gegenwart bestimmter Vitamine bzw. Wirkstoffe wachsen könne, wurde versucht, die in der Kulturflüssigkeit von *Exobasidium Azaleae* vorhandenen Wirkstoffe mit den entsprechenden Mikroorganismen nachzuweisen. Die spezifischen Testorganismen wurden von der American Type Culture Collection (ATCC), 2029 M Street. N. W. Washington, D. C. bezogen und auf Difco Basalmedien kultiviert. Die Difco Basalmedien (Difco Laboratories inc. Detroit, Michigan USA) stellen für die jeweiligen Organismen optimale Nährlösungen ohne den lebenswichtigen Wirkstoff dar.

Zu den Versuchen wurden jeweils 5 ccm Lösung von Difco Basalmedium mit 5 ccm Nährlösung XI oder 5 ccm Substanzlösung als Vergleichsproben

oder 5 ccm Kulturfiltrat zur Prüfung auf den entsprechenden Wirkstoff in Reagenzgläsern beimpft und 48 Stunden bei 39 °C bebrütet. Hierbei wurden Kulturflüssigkeiten verwendet, welche weder Restmengen an dl-Glutaminsäure noch unverbrauchte Glukose enthielten. Um den Wirkstoffgehalt von Nährlösung und Kulturflüssigkeit miteinander vergleichen zu können, wurde die während der Kulturdauer verdunstete Flüssigkeit durch Wasser ersetzt. Ein Vergleich von Nährlösung und Kulturflüssigkeit war erforderlich, da auch schon in der Nährlösung XI in geringem Maße dieselben Wirkstoffe (Begleiter der Glukose) vorhanden waren, welche von *Exobasidium* gebildet wurden. Bei den Bakterien wurde der Vergleich nephelometrisch durchgeführt, während bei den Pilzen die Trockengewichte miteinander verglichen wurden.

Zu 5 ccm Difco Grundlösung wurden 5 ccm Kulturfiltrat mit 40 mg Myzelwert bzw. 5 ccm Substanzlösung in Konzentrationen von 1, 100 und 500 γ% gegeben. Die Ansätze wurden zur Sterilisation 20 Minuten bei 100 °C im Dampftopf erhitzt.

Es wurden folgende Wirkstoffe mit den entsprechenden Testorganismen und Difco Basalmedien mikrobiologisch geprüft:

Wirkstoff: Vitamin B_1.
Testorganismus: *Lactobacillus fermenti* 36 (ATCC 9338).
Difco Basalmedium: Bacto Thiamin Assay Medium 0326—15.

Wirkstoff: Biotin.
Testorganismus: *Lactobacillus arabinosus* 17/5 (ATCC 8014).
Difco Basalmedium: Bacto Biotin Assay Medium 0416—15.

Wirkstoff: Nikotinsäure und Nikotinsäureamid.
Testorganismus: *Lactobacillus arabinosus* 17/5 (ATCC 8014).
Difco-Basalmedium: Bacto Niacin Assay Medium 0322—15.

Wirkstoff: Inosit.
Testorganismus: *Neurospora crassa* 37401 (ATCC 9683).
Difco Basalmedium: Bacto Inositol-PAB Assay Medium 0576—15.

Wirkstoff: Pantothensäure und deren Salze.
Testorganismus: *Lactobacillus arabinosus* 17/5 (ATCC 8014).
Difco Basalmedium: Bacto Pantothenat Medium USP 0604—15.

Wirkstoff: p-Aminobenzoesäure.
Testorganismus: *Neurospora crassa* 9278.
Difco Basalmedium: Bacto Inositol-PAB Assay Medium 0575/5.

Nach der Aufstellung diente *Lactobacillus fermenti* zum Nachweis von Vitamin B_1 und *Lactobacillus arabinosus* zum Nachweis von Biotin, Nikotinsäure und Pantothensäure. Während die Proben von Biotin, Nikotinsäure und Pantothensäure mit 5 ccm Nährlösung nach 48 Stunden Bebrütung schwache Trübungen infolge Bakterienentwicklung zeigten, traten in den Kulturen mit Zusatz von 5 ccm Kulturflüssigkeit (Kulturfiltrat) starke Bakterientrübungen auf. Somit waren Biotin, Nikotinsäure bzw. Nikotinsäureamid und Pantothensäure in der Kulturflüssigkeit in größeren Mengen vorhanden als in der Nährlösung und demnach also von *Exobasidium* gebildet worden.

Bei den Proben auf Vitamin B_1 war das Bakterienwachstum nach 48 Stunden bei Zusatz von 5 ccm Kulturfiltrat, 5 ccm Nährlösung XI und 5 ccm 1, 100 und 500 γ%iger Substanzlösung gleich gut. Bei Zusatz von 2 ccm Nährlösung XI bzw. 2 ccm Kulturflüssigkeit war das Bakterienwachstum geringer als bei den entsprechenden Zusätzen von 5 ccm. Somit war also Vitamin B_1 schon in der Nährlösung in Spuren vorhanden und nicht von *Exobasidium Azaleae* gebildet worden. (Spätere Teste mit *Phycomyces blakesleeanus* waren ebenfalls negativ.) Wäre das nachgewiesene Vitamin B_1 von *Exobasidium* gebildet worden, dann hätten bei den Zusätzen von 2 ccm die Kulturen mit Zusatz von Kulturflüssigkeit stärkeres Bakterienwachstum zeigen müssen, als die Kulturen mit Zusatz von 2 ccm Nährlösung. Beim nephelometrischen Vergleich von Nährlösung, Kulturflüssigkeit und 100 γ%iger Substanzlösung mit dem Kompensationsphotometer von Leitz wurden folgende relativen Intensitätswerte gemessen:

Tabelle 9

5 ccm Difco-Nährlösung mit Zusätzen

Wirkstoff	+ 5 ccm Nährlösung XI	+ 5 ccm Kulturfiltrat	+ 5 ccm Substanzlösung 100 γ%
Biotin	45 39 49	329 318 315	196 187 195
Nikotinsäure	70 68 75	326 331 310	279 255 253
Pantothensäure	26 30 28	243 244 251	142 154 155
Vitamin B_1	5 ccm Difco-Lösung mit Zusatz von		
	5 ccm Nährlösung XI		144 177 154
	5 ccm Kulturfiltrat		173 150 172
	5 ccm 500 γ% Substanzlösung		179 199 184
	5 ccm 100 γ% Substanzlösung		192 201 205
	5 ccm 1 γ% Substanzlösung		179 176 199
	2 ccm Nährlösung XI		132 158 145
	2 ccm Kulturflüssigkeit		75 87 63

Zum Nachweis von Inosit und p-Aminobenzoesäure dienten zwei verschiedene Stämme von *Neurospora crassa*. Bei der Prüfung auf Inosit waren die Proben mit Nährlösung fast negativ, die Proben mit Kulturflüssigkeit aber positiv und zeigten deutliches Pilzwachstum. Bei der Prüfung auf p-Aminobenzoesäure war das Myzelwachstum bei Zusatz von 5 ccm Kulturflüssigkeit und bei Zusatz von 5 ccm Nährlösung gleich schwach im Gegensatz zu den Vergleichsproben mit 5 ccm 100 γ%iger Substanzlösung.

Aus diesen beiden Versuchen ergab sich, daß Inosit von *Exobasidium* gebildet wird, während p-Aminobenzoesäure nicht in der Kulturflüssigkeit nachgewiesen werden konnte.

Die Tatsache, daß auch die Nährlösung bei der Prüfung auf Wirkstoffe positiv reagierte, war nicht verwunderlich, da die Mikroorganismen schon auf geringste Spuren ansprechen. So kann z. B. nach Kretzschmar (1955) mit *Lactobacillus arabinosus* noch 1 mγ Biotin nachgewiesen werden. Außerdem erwähnt Kretzschmar schon, daß gereinigte Glukose Biotin enthält, so daß

mit diesen positiven Reaktionen bei der Nährlösung XI gerechnet werden mußte. Da aber die Nährlösung selbst schon Wirkstoffe enthielt, bot sich in der mikrobiologischen Bestimmungsmethode und den nephelometrischen Intensitätswerten eine gute Möglichkeit, den Wirkstoffgehalt von Nährlösung und Kulturfiltrat miteinander zu vergleichen.

V. BESPRECHUNG DER UNTERSUCHUNGEN

Der Parasitismus der gallenbildenden Exobasidien erweckt durch die Fähigkeit der Gallbildung besonderes Interesse. Bevor aber die Frage der Gallbildung irgendwie angegangen werden kann, muß die Kultur dieses Pilzes näher bekannt sein. Es war daher notwendig, Nährmedien herzustellen, welche erlaubten, diesen Parasiten längere Zeit in künstlicher Kultur zu halten. Es sind schon einige Arten kultiviert worden, z. B. von WORONIN (1867) *Exobasidium vaccinii* (Fuck.) Woronin auf Deckgläsern in Wasser ohne Zusätze. Derselbe Pilz wurde von BREFELD (1889) auf fruchtsafthaltigen Nährlösungen kultiviert. GRAAFLAND (1953) kultivierte zwar schon vier *Exobasidium*-Arten, benutzte aber ebenfalls wieder pflanzensafthaltige Nährlösungen, welche er außerdem, wie BREFELD, so unvollständig definierte, daß seine Angaben für diese Untersuchungen nicht verwandt werden konnten. Somit lagen keine brauchbaren Angaben über verwendbare Nährlösungen vor.

Es mußten daher zunächst einmal rein empirisch Nährlösungen zusammengesetzt werden. Diese Nährlösungen sollten vollsynthetisch sein, also von genau definierter Zusammensetzung und ferner so beschaffen, daß die wesentlichen Nährstoffe nach einer gewissen Zeit der Kultivierung verbraucht, also keine wesentlichen Restmengen an Nährstoffen mehr vorhanden sind.

Nach einigen Versuchen wurde die Nährlösung III benutzt, welche neben 6 % Glukose, 0,5 % l-Asparagin, 0,2 % KH_2PO_4 und 0,2 % $MgSO_4$ enthielt, und zwar 10 ccm in 100-ccm-Erlenmeyerkölbchen. Die optimalen gegenseitig abgestimmten Mengen der beiden organischen Nährstoffe wurden in Reihenversuchen ermittelt, indem nach bestimmter Kulturzeit die Restzuckermenge neben dem Trockengewicht der Pilzmasse ermittelt wurde. Asparagin-Überschuß machte sich im Steigen des pH-Wertes von 4,5 nach 6 bemerkbar, während derselbe bei Verbrauch sämtlichen Asparagins auf pH 4 bis 3,8 sank.

So wurde eine Nährlösung zusammengesetzt, welche als optimale Mengen 7 % Glukose, 0,1 % l-Asparagin sowie je 0,2 % KH_2PO_4 und $MgSO_4$ enthielt. Wurde der Pilz auf dieser Nährlösung kultiviert, dann blieb das Myzelgewicht nach 25 Tagen konstant; nach 35 Tagen Kulturdauer war auch sämtlicher Restzucker verbraucht. Verwendung von höher konzentrierten Nährlösungen brachte keinen Vorteil, während größere Mengen Nährlösung (Nährlösung V) in gleicher Schichthöhe wie in den 100-ccm-Erlenmeyerkolben und in Fernbachkolben zur Gewinnung größerer Mengen von Myzel bzw. von Kulturfiltrat günstig waren. Die Konzentration von 0,2 % Salzen und die einfache Konzentration der Nährlösung sowie die geringe Schichthöhe der Nährlösung wurden vor allem beibehalten, um eine möglichst schnelle Erschöpfung der Nährlösung zu erreichen. Als weitere N-Quellen wurden dl-Glutaminsäure, l-Glutaminsäure, dl-Alanin, Glykokoll und Leucin ver-

wendet, von denen besonders dl-Glutaminsäure die besseren Ergebnisse brachte (Nährlösung IX bis XI). Bei den weiteren Versuchen wurde eine Nährlösung mit dl-Glutaminsäure als Stickstoffquelle benutzt, denn bei Verwendung von l-Asparagin waren Kulturflüssigkeit und Sproßmyzel aus bisher unerklärlichen Gründen rotbraun statt gelbbraun gefärbt, während bei Verwendung von dl-Glutaminsäure diese Erscheinung nicht auftrat. Obwohl ein Lösungsgemisch von Saccharose mit l-Asparagin (Nährlösung XII) gleichmäßig gefärbte hellgelbe Kulturen aufwies, wurde diese Zusammenstellung nicht benutzt, da die restliche Saccharose nicht mit FEHLINGscher Lösung bestimmt werden konnte.

Aus der Tatsache, daß *Exobasidium Azaleae* auf einer Nährlösung mit einem einfachen Zucker, einer Aminosäure als Stickstoffquelle und zwei Mineralsalzen kultiviert werden konnte, geht hervor, daß die Verwendung von Pflanzen- bzw. Frucht-Preßsäften nicht unbedingt notwendig ist. Vitamine sind zum rein vegetativen Wachstum nicht erforderlich, vielleicht noch nicht einmal wachstumsfördernd, da sich bei Zusatz der Vitamine B_1, B_2, C und Nikotinsäureamid zu Nährlösung VII und XI keine größeren Mengen an Trockenmyzel ergaben. Andererseits dürfte die Basidienbildung auf den Gallen trotzdem von gewissen Wirkstoffen abhängen, da dieselbe bei diesen Kulturen nicht erreicht werden konnte.

Da in den Kulturen neben kurzen Sproßsporen alle Übergangsformen bis zu feinen Myzelien, welche mit den Myzelien der Gallen identisch waren, gefunden wurden, konnte die in Kultur befindliche Myzelform des Pilzes der in den Gallen auftretenden gleichgesetzt werden und somit von der Kulturform die gleichen physiologischen Eigenschaften erwartet werden, welche die Gallbildung hervorrufen, wenn auch Basidienbildung nicht eintrat. Die Feststellung GRAAFLANDS, daß in seinen Kulturen von *Exobasidium japonicum* Shir. nur „Blastosporen" auftraten, wird verständlich, wenn man berücksichtigt, daß er nur pflanzliche Preßsäfte als Nährmedien verwandte und bei diesen, wie bei den auch hier durchgeführten Versuchen mit Tomatensaft vornehmlich Sproßsporen auftraten. Wie auch schon BREFELD feststellte, scheint die Bildung der Sproßsporen aber nicht nur von der Art der Nährlösung, sondern auch von der Einwirkung der Luft abhängig zu sein, da untergetaucht wachsende Teile eher myzelförmig werden.

Wie bei den Infektionsversuchen an Azaleen festgestellt wurde, war die Gallenbildung nicht nur von der Art der Sporen (Gallensporen oder Kultursporen), bei Kultursporen von der Art der verwendeten Nährlösung oder von der Tatsache abhängig, ob die Blättchen vor der Beimpfung verletzt wurden oder nicht, sondern auch bei den verschiedenen Versuchspflanzen verschieden. Obwohl alle Pflanzen der Sorte Hexe angehörten, traten bei einigen von ihnen nach Beimpfung der gleichen Anzahl von Triebspitzen 30 bis 40 Gallen auf, während bei anderen Pflanzen unter gleichen Bedingungen (vorherige Verletzung) nur 2 bis 3 oder überhaupt keine Gallen entstanden. Vielleicht ließe sich auf Grund dieser Beobachtung eine Vermeidung des Pilzbefalles herbeiführen, indem nur von den nicht infizierbaren, d. h. nicht gallenbildenden Pflanzen, neue Jungpflanzen herangezogen werden. Da in der Azaleen-

zucht eine Vermehrung durch Stecklinge üblich ist, würde man auf diese Weise sehr schnell zu *exobasidium*-armem oder sogar zu *exobasidium*-freiem Zuchtmaterial gelangen können. Die größte Bereitschaft zur Gallenbildung wurde im Gegensatz zu den Beobachtungen GRAAFLANDS in den Monaten Juli, August, September und Oktober festgestellt. Da der Pilz in Form von jungen Infektionshyphen in den jungen Blättchen der nächstjährigen Triebspitzen überwintert, wird diese reiche Gallen- bzw. Sporenbildung im Spätsommer und Herbst verständlich, da nur auf diese Weise die Erhaltung der Art des Pilzes garantiert werden kann. Auch bei Preiselbeere und Rhododendron kann man im Sommer und Herbst zahlreiche Gallen von *Exobasidium vaccinii* bzw. *Exobasidium rhododendri* feststellen.

Nachdem mit dem Bohnen- und Hafertest weder Traumatin noch Heteroauxin in der Kulturflüssigkeit festgestellt werden konnte, war es erforderlich, andere Nachweismethoden für die Wuchsstoffe anzuwenden.

Es wurden Gewebekulturen mit kambiumhaltigen Gewebestückchen von *Daucus carota* auf Nährlösung nach WHITE hergestellt. Durch Zusatz von Kulturflüssigkeit zu dieser Nährlösung ließ sich die Wachstumsintensität des Karottengewebes deutlich steigern. Die Frisch- bzw. Trockengewichte der Gewebestücke auf Nährlösung mit Zusatz von Kulturflüssigkeit waren zwei- bis dreimal so hoch wie die Vergleichsstücke in reiner Nährlösung. In weiteren Versuchen konnte nachgewiesen werden, daß die Wirkstoffe hitzebeständig und in Äther und Chloroform löslich sind. Auf Hausschwammsporen übte die Kulturflüssigkeit zusammen mit organischen Säuren (Zitronensäure usw.) dieselbe Wirkung aus wie die Kulturfiltrate verschiedener Schimmel- und Bläue-Pilze und die Wirkstoffe der B_1-Gruppe Biotin, Inosit, ferner Nikotinsäure und Nikotinsäureamid, Pantothensäure und p-Aminobenzoesäure (CZAJA und POMMER 1959). Da es mit einigen der oben aufgeführten Vitamine ebenfalls möglich war, das Gewebewachstum von Karottenstückchen zu fördern, wurde vermutet, daß von *Exobasidium Azaleae* ebenfalls die oben aufgeführten Wirkstoffe oder einige von diesen gebildet würden. Diese Wirkstoffe wurden mikrobiologisch nachgewiesen, indem die Eigenart verschiedener Bakterien- und Pilzstämme, nur in Anwesenheit für sie spezifischer Vitamine zu wachsen, benutzt wurde. Die Bakterien bzw. Pilze wurden auf Difco Basalmedien kultiviert, welche für jeden Mikroorganismus besonders zusammengestellt sind und außer dem lebenswichtigen spezifischen Vitamin alle anderen erforderlichen Nährlösungsbestandteile enthalten. Nach Zusatz des nun noch fehlenden Vitamins in Form von Kulturflüssigkeit oder in Form von Substanzlösung als Vergleichsprobe zeigten die Kulturen schon bald nach der Beimpfung deutliches Wachstum oder bei Abwesenheit des spezifischen Wirkstoffes keine Veränderung.

Mit dieser Methode gelang es, im Kulturfiltrat von *Exobasidium Azaleae* Biotin, Nikotinsäure bzw. Nikotinsäureamid und Pantothensäure bzw. deren Salze mit verschiedenen Stämmen von *Lactobacillus arabinosus* nachzuweisen. Die Proben auf Vitamin B_1 mit *Lactobacillus fermenti* verliefen negativ. Zum Nachweis von Inosit und p-Aminobenzoesäure dienten zwei verschiedene Stämme von *Neurospora crassa;* die Probe auf Inosit war positiv, während

p-Aminobenzoesäure von *Exobasidium Azaleae* anscheinend nicht gebildet wird, da die Proben mit Kulturflüssigkeit und Nährlösung XI gleich starkes Wachstum aufwiesen.

Da auch die zur Kultur des Pilzes verwendete Nährlösung XI schon geringe Mengen der von *Exobasidium* gebildeten Wirkstoffe einschließlich Vitamin B_1 und p-Aminobenzoesäure enthielt, war es erforderlich, die Wachstumsintensität der Mikroorganismen in Nährlösung und Kulturflüssigkeit miteinander zu vergleichen. Bei den Bakterien wurden nephelometrische Messungen durchgeführt, während bei den Pilzen die gebildeten Myzelmengen miteinander verglichen wurden. Bei Vitamin B_1 und p-Aminobenzoesäure war die Wachstumsintensität in Nährlösung und Kulturflüssigkeit gleich; bei den übrigen Proben wuchsen die Mikroorganismen bei Zusatz von Kulturfiltrat wesentlich besser als bei Zusatz von Nährlösung. Somit wurden die Wirkstoffe Biotin, Inosit, Nikotinsäure bzw. Nikotinsäureamid und Pantothensäure bzw. deren Salze in der Kulturflüssigkeit von *Exobasidium Azaleae* nachgewiesen, Wirkstoffe, welche bei den Kambiumgewebestückchen der Karotte das Gewebewachstum fördern, vermutlich also auch an den Blättern der Azalee ähnliche Wirkungen ausüben, welche mit zur Gallenbildung führen. Jedoch werden nicht allein die bei diesen Untersuchungen gefundenen Wirkstoffe die Gallbildung hervorrufen. Zur Gallbildung ist wahrscheinlich ein größerer Komplex von Wirkstoffen und Wuchsstoffen erforderlich, welche zum Teil vom Pilz (Wirkstoffe), zum Teil von der Azalee (Wuchsstoffe) geliefert werden. Wurde zu Gewebekulturen des Karottenkambiums außer Kulturfiltrat auch noch β-Indolylessigsäure zugesetzt, so wurde das Wachstum der Gewebestückchen noch stärker gefördert als bei Zusatz von Kulturflüssigkeit allein. Hieraus kann man vielleicht schließen, daß die von *Exobasidium Azaleae* erzeugten Wirkstoffe (Plasmawuchsstoffe) Zellteilungen hervorrufen, während die Wirtspflanzen Zellstreckungshormone und Baustoffe liefern. Die Frage, ob noch weitere bekannte oder bisher auch noch gänzlich unbekannte, zum Teil vielleicht für *Exobasidium* spezifische, gallenbildende Stoffe vom Parasiten gebildet werden, muß zunächst noch offenbleiben.

Zusammenfassung

1. *Exobasidium Azaleae* Peck. wird auf einer vollsynthetischen Nährlösung aus Basidiosporen und Sproßsporen (abgeimpft von reifen Gallen) kultiviert.

2. Auf 10 ccm einer Nährlösung, welche 7 % Glukose und 0,1 % l-Asparagin neben 0,2 % KH_2PO_4 und 0,2 % $MgSO_4$ enthält, erreicht das Myzeltrockengewicht nach 25 Tagen rund 120 mg. In dieser Zeit wird das l-Asparagin vollständig verbraucht; der restliche Zucker von etwa 1,5 % wird in den folgenden 10 Tagen ebenfalls noch restlos aufgezehrt.

3. Eine weitere optimale Nährlösung enthält 5 % Glukose, 0,2 % dl-Glutaminsäure und ebenfalls wieder 0,2 % KH_2PO_4 und 0,2 % $MgSO_4$. In 10 ccm Nährlösung werden nach 20 Tagen Kulturdauer Zucker und Aminosäure vollständig verbraucht und 120 mg Trockenmyzel gebildet.

4. Mit diesen beiden Nährlösungen (Nährlösung VII und IX) gelingt es bei regelmäßigem Abimpfen auf neue Nährlösung — bei diesen Versuchen im Abstand von 30 Tagen — den Pilz unverändert in Kultur zu halten. Bis jetzt hielten sich derartige Kulturen 3 Jahre lang.

5. In diesen Nährlösungen befindet sich der Pilz zum größten Teil in Form von Sproßsporen und als grobes bis feines, fadenförmiges Myzel. Auch dieses Myzel kann meistens wieder in kurze stäbchenförmige Sproßsporen zerfallen.

6. Mittels der Sporensuspensionen der Nährlösungskulturen können Infektionen an sehr jungen Blättchen der *Azalea indica* durchgeführt werden, selbst mit Sporen, welche bereits 24 Monate nach 24 Passagen in Kultur gehalten wurden.

7. Die Kulturflüssigkeit der Sporenkulturen enthält nach Erschöpfung des l-Asparagins bzw. der dl-Glutaminsäure und des Zuckers nach Abfiltrieren der Sporen bzw. des Myzels Wirkstoffe, welche bei Zusatz von 1 % Zitronensäure wie die wasserlöslichen Wirkstoffe der B_1-Gruppe die Sporen von *Merulius lacrymans* zur Keimung bringen (CZAJA und POMMER 1959).

8. Die gleiche Kulturflüssigkeit enthält nach der gleichen Form der Gewinnung Wirkstoffe, welche kambiumhaltige Gewebestückchen aus der Wurzel von *Daucus carota* (Kulturform) in steriler Kultur und Zugabe von Nährlösung nach WHITE im Wachstum fördern und das Trockengewicht dieser Gewebestückchen innerhalb von 30 Tagen von 0,3 auf 5 bis 7 mg bringen gegenüber den Kontrollen in Nährlösung nach WHITE von 0,3 auf 2 bis 3 mg Trockengewicht.

9. In Vergleichsversuchen mit kambiumhaltigen Gewebestückchen der Wurzel von *Daucus carota* in Nährlösung nach WHITE können durch Zugabe von z. B. 500 γ% Mesoinosit bzw. Biotin ähnliche wachstumsfördernde Wirkungen erzielt werden.

10. Im mikrobiologischen Test mit *Lactobacillus arabinosus* gelang es, im Kulturfiltrat Biotin, Nikotinsäure bzw. Nikotinsäureamid und Pantothensäure bzw. deren Salze nachzuweisen.

11. Im entsprechenden mikrobiologischen Nachweis mit *Neurospora crassa* auf inosit-freiem Nährboden war Inosit im Kulturfiltrat ebenfalls positiv. Es besteht mithin die Wahrscheinlichkeit, daß bei der Gallenbildung durch *Exobasidium Azaleae* auf den Blättern von *Azalea indica* unter anderen spezifischen Wirkstoffen Mesoinosit und Biotin beteiligt sind.

12. Die Proben auf Vitamin B_1 mit *Lactobacillus fermenti* und auf p-Aminobenzoesäure mit *Neurospora crassa* waren negativ.

Summary

Investigation on the physiology of development of *Exobasidium Azaleae* Peck. and its infection of the host plants, with particular reference to substances stimulating gall formation

1. *Exobasidium Azaleae* Peck. was cultured on a full synthetic nutrient medium from basidiospores and bud spores (transferred from mature galls).

2. On 10 ccm. of a nutrient medium that contained 7 % glucose and 0.1 % l-asparagin, together with 0.2 % KH_2PO_4 and 0.2 % $MgSO_4$, the dry weight of the mycelium reaches about 120 mg. after 25 days. In this period the l-asparagin is fully consumed; the remaining sugar, amounting to about 1.5 %, is also completely consumed in the following 10 days.

3. Another optimal nutrient solution contains 5 % glucose, 0.2 % dl-glutamic acid and again also 0.2 % KH_2PO_4 and 0.2 % $MgSO_4$. In 10 ccm. of this solution the sugar and amino acid are fully consumed after 20 days of culture and 120 mg. dry mycelium is formed.

4. With these two nutrient solutions (Nutrient media VII and XI) one can maintain the fungus in culture unchanged, provided that it is transferred regularly to new solutions: this was done at intervals of 30 days in these experiments. Up to now such cultures have been maintained for 3 years.

5. In these nutrient solutions the fungus is found mostly in the form of bud spores and as a rough to fine, thread-like mycelium. This mycelium can also often break up again into short rod-like bud spores.

6. By means of a spore suspension of cultures in a nutrient solution infections can be made on very young leaflets of *Azalea indica*, even with spores that have already been kept in culture for 24 months with 24 transfers.

7. The liquid in which the spores have been cultured, after the l-asparagin or the dl-glutamic acid and the sugar have been exhausted and the spores or mycelium have been filtered off, contains active substances which in the presence of 1 % citric acid and water-soluble substances of the B_1 group will stimulate the spores of *Merulius lacrymans* to germinate (Czaja and Pommer, 1959).

8. The same culture liquid, prepared in a similar way, contains active substances which promote growth in pieces of tissue of the roots of *Daucus carota* (cultivated form) that contain cambium, if some of White's nutrient solution is added to the sterile culture; the dry weight of these pieces of tissue increased from 0.3 to 5—7 mg. within 30 days, compared with an increase from 0.3 to 2—3 mg. in dry weight in controls kept in the White medium.

9. In comparative experiments with tissue pieces of *Daucus carota* roots containing cambium, grown in the White medium with the addition of say 500 γ% of mesoinositol or biotin, similar effects of growth stimulation were obtained.

10. In a microbiological test with *Lactobacillus arabinosus* it was possible to detect biotin, nicotinic acid or nicotinic amide, and pantothenic acid or its salts in the culture filtrate.

11. In a corresponding microbiological test with *Neurospora crassa* on inositol-free nutrient substrates the test for inositol in the culture medium was also positive. It therefore seems probable that mesoinositol and biotin, together with other specific stimulant substances, take part in the formation of galls on the leaves of *Azalea indica* by *Exobasidium azaleae*.

12. Tests for vitamin B_1 with *Lactobacillus fermenti* and for p-aminobenzoic acid with *Neurospora crassa* were both negative.

Die Untersuchungen wurden von Sommer 1956 bis Frühjahr 1959 im Botanischen Institut der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen durchgeführt.

Literaturverzeichnis

1. Bonner, J., and J. English, 1938: A chemical and physiological study of Traumatin, a plant wound hormone. Plant Physiology **13**, 331—347.
2. — —, — — and A. J. Hagen Smith, 1939: The wound hormones of plants II. The Isolation of a Crystalline Active Substance. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **25**, 323—329.
3. — —, — — and — —, 1939: The wound hormones of plants IV. Structure and Synthesis of Traumatin. J. Am. Chem. Soc. **61**, 3434—3436.
4. Brefeld, O., 1819: Untersuchungen aus dem Gesamtgebiet der Mykologie. Leipzig **VIII**, 12—18.
5. Caplin, S. M., and F. C. Steward, 1948: Effect of Coconut milk on the growth of explants from Carrot root. Science **108**, 656—657.
6. — — and — —, 1952: Investigations on the Growth and Metabolism of Plant Cells II. Variables affecting the Growth of Tissue explants and the Development of a quantitative Method, using Carrot Root. Ann. Bot. **XVI**, 219—234.
7. Cramer, F., 1953: Papierchromatographie. Verlag Chemie Weinheim.
8. Czaja, A. Th., und E. H. Pommer, 1959: Untersuchungen über die Keimungsphysiologie der Sporen holzzerstörender Pilze: *Merulius lacrymans* und *Coniophora cerebella*. Qualitas Plantarum et Materiae Vegetabiles **V**, 209—267.
9. Difko Manual, 1953: Ninth Edition. Detroit.
10. Fischer, E., und E. Gäumann, 1929: Biologie der pflanzenbewohnenden parasitischen Pilze. Fischer, Jena.
11. Graafland, W., 1957: *Exobasidium Japonicum* op *Azalea*. Meded. Landbowhoogesch. Opzoek. stat. Gent **XXII**, 3, 547—551.
12. — —, 1953: Four cultures of *Exobasidium* in pure culture. Acta bot. Neerl. **I**, 516 bis 522.
13. Grüne, A., 1955: Papierchromatographie. Arbeitsmethodik. Schleicher und Schüll, Dassel.
14. — —, 1957: Papierchromatographie und Papierelektrophorese. Chimia **11**, 173—203 und 213—256.
15. Haberland, G., 1923: Wundhormone als Erreger von Zellteilungen. Beitr. allg. Bot. **2**, 1—50.
16. Hager, 1949: Handbuch der pharmazeutischen Praxis. Springer Berlin **2**, 599.
17. Kretzschmar, H., 1955: Hefe und Alkohol. Springer, Berlin.
18. Laubert, R., 1932: Sorauer, P., Handbuch der Pflanzenkrankheiten. Paul Parey, Berlin, **3**, 282.
19. Linskens, H. F., 1955: Papierchromatographie in der Botanik. Springer, Berlin.
20. Söding, H., 1952: Die Wuchsstofflehre. Thieme, Stuttgart.
21. Steward, F. C., and S. M. Caplin, 1951: A tissue culture from potato. The synergistic action of 2,4 D and Coconutmilk on the growth of explants from potato tuber. Science **113**, 518—521.
22. Wehnelt, B., 1927: Untersuchungen über das Wundhormon der Pflanzen. J. wiss. Bot. **66**, 773—815.
23. White, Ph. R., 1954: The Cultivation of animal and Plant cells. New York.
24. Woronin, M., 1867: *Exobasidium vaccinii*. Ber. Verh. naturforsch. Ges. Freiburg i. B. **IV**, 367—416.

Kurze Mitteilung

Aus der Biologischen Zentralanstalt
der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin,
Institut für Phytopathologie Aschersleben
Direktor: Prof. Dr. M. Klinkowski

Untersuchungen über eine Mosaikkrankheit an *Viburnum opulus* L.

Von

K. Schmelzer und H. O. Schmidt

Mit 2 Abbildungen

Seit Baur (1904, 1906, 1907, 1908) seine klassischen Untersuchungen über Viruskrankheiten hauptsächlich an Ziergehölzen durchführte, ist das Interesse an Virosen dieser Pflanzengruppe niemals völlig erloschen. Im Verhältnis zu den Viren der krautigen Pflanzen und der Obstgehölze ist jedoch ihre Bearbeitung wenig gefördert worden. Bisher hat man nur selten versucht, diese Viren durch Preßsaftverimpfung auf krautige Pflanzen zu übertragen. In neuester Zeit ist die Erkenntnis gewonnen worden, daß gleiche oder nahe verwandte Viren sowohl an Obstgehölzen als auch an krautigen Pflanzen auftreten können (siehe z. B. Willison und Weintraub 1957). Vermutlich bestehen auch Beziehungen zwischen Viren der Ziergehölze und Viren der krautigen Pflanzen und Obstgehölze. Deshalb dürfte die Untersuchung der Ziergehölzvirosen die Möglichkeit bieten, verschiedene Lücken in der Kenntnis der Epidemiologie pflanzlicher Virosen zu schließen. Langlebige, verholzte Zierpflanzen könnten ebenso wie Zierpflanzenstauden wirkungsvolle Virusreservoire darstellen.

Im Jahre 1959 bemerkte einer von uns (Schmelzer) in einem Garten in der Feldflur von Aschersleben etwa fünfundzwanzig Sträucher von *Viburnum opulus* L., die als Windschutz vor einem Bienenstand dienten. Mindestens zwei Drittel dieser drei bis vier Meter hohen Sträucher zeigten sehr deutliche Blattscheckungen. Sie bestanden in einer hellgrünen bis weißlichen Marmorierung, die zum Teil die Blattadern begleitete, in anderen Fällen unregelmäßig verteilt war, nicht selten jedoch band- bis ringförmige Muster bildete (Abb. 1).

Schwache Blattverbeulungen und -deformationen konnten die Verfärbungen begleiten. Veränderungen der Wuchsform und Beeinträchtigungen des Wachstums wurden im Vergleich zu den symptomlosen Sträuchern nicht beobachtet.

Noch im Sommer desselben Jahres wurden mit Blättern versehene Augen, Triebspitzen und bewurzelte Sprosse, die von kranken Pflanzen gewonnen waren, mit gesunden, zweijährigen Sämlingen von *Viburnum opulus* vereinigt. Nach dem Vortreiben im Januar bzw. Februar 1960 zeigten 9 von 18 gepfropften, ursprünglich gesunden Pflanzen Mosaikerscheinungen. Die Symptome erschienen erst, nachdem die Blätter etwa ein Drittel ihrer endgültigen Größe erreicht hatten. Die Scheckungen waren weniger deutlich als an den kranken Freilandpflanzen, die gleiche Abschwächung war jedoch auch an gleichzeitig im Gewächshaus getriebenen kranken Stecklingen zu bemerken.

Abb. 1. Mosaikkranke Blätter von *Viburnum opulus*. Unten rechts: Gesundes Blatt

Mehrfach wurde versucht, ein Virus von kranken *Viburnum*-Stecklingen bzw. von durch Pfropfung infizierten Unterlagen auf krautige Pflanzen zu übertragen. Dazu wurden vorgetriebene Knospen oder noch nicht völlig entwickelte Blätter zusammen mit neutralem Phosphatpuffer zerrieben. Es kam nach etwa sechs Tagen zu zahlreichen chlorotischen Flecken an mechanisch beimpften Blättern von *Chenopodium quinoa* Willd. und wenige Tage später zu Verbiegungen der Pflanzen und einem Mosaik der Folgeblätter (Abb. 2, unten links). Auch Gurken zeigten an den abgeriebenen Keimblättern wenige runde chlorotische Flecke. Meist erst eine Woche danach entstand an den Folgeblättern ein Mosaik mit dunkelgrünen, blasig aufgetriebenen Stellen (Abb. 2, oben). Starke Krankheitserscheinungen ließen Pflanzen von *Petunia hybrida* hort. ex Vilm. erkennen. Nach deutlicher Adernaufhellung bildeten die Folgeblätter gelbliche Scheckungen aus. Die Blattstiele blieben anfangs kurz, und die Blätter verdrehten sich, so daß die Pflanzen Rosetten bildeten. Späterhin streckten sich die Blattstiele etwas. Mosaik, Verkleinerung und Deformation der Blätter blieben jedoch erhalten (Abb. 2, unten rechts). Preß-

Abb. 2. Symptome von Pflanzen, die mit Preßsaft aus mosaikkranken *Viburnum opulus* beimpft wurden. Oben: *Cucumis sativus* (rechts: gesund). Unten links: *Chenopodium quinoa* (mit Kontrolle). Unten rechts: *Petunia hybrida*. Aufnahmen etwa einen Monat nach der Infektion

saft aus Knospen oder Blättern gesunder bzw. symptomfreier *Viburnum*-Pflanzen bewirkte keine derartigen Krankheitserscheinungen an den drei genannten Testpflanzenarten.

Mittels Preßsaft kranker Petunien wurden weitere Pflanzenarten mechanisch beimpft. Bis jetzt erwiesen sich durch Symptombild und Rücktest sechzehn Arten als anfällig. Sie gehören den folgenden sieben Familien an: *Chenopodiaceae, Cucurbitaceae, Gentianaceae, Leguminosae, Primulaceae, Solanaceae* und *Verbenaceae*. Die Krankheitserscheinungen sind in den meisten Fällen sehr stark von denjenigen verschieden, die das mechanisch übertragbare, von gelbnetzkranken Forsythien isolierte Virus verursacht (Schmelzer und Schmidt 1959). Das vom Schneeball isolierte Virus wird zur Zeit auf seine eventuelle Identität mit anderen Viren untersucht. Es dürfte seinen Symptomen nach ein typisches Mosaikvirus darstellen, *Myzus persicae* Sulz. erwies sich als Überträger.

Die genannten Tatsachen sprechen dafür, daß ein Befall des Schneeballs zu einer Verseuchung auch räumlich weit entfernt stehender krautiger Pflan-

zen aus verschiedenen Familien führen könnte, falls Blattläuse vorhanden sind, die Überträgereigenschaften besitzen und sich als fluglustig sowie wenig wählerisch bei der Nahrungsaufnahme erweisen. Die bisherigen Befunde reichen noch nicht zur Entscheidung der Frage aus, ob das auf krautige Pflanzen übertragbare Virus die Mosaiksymptome an *Viburnum opulus* hervorruft oder ob es lediglich ein Begleiter des Schneeball-Mosaikvirus ist.

Nach unserer Kenntnis sind bisher noch keine Viruserkrankungen an Schneeball exakt nachgewiesen worden. Sie scheinen jedoch nicht allzu selten zu sein. Ebenfalls im Jahre 1959 beobachtete einer von uns in Ungarn am Ufer des Plattensees einen Strauch von *Viburnum opulus* var. *sterile* DC. mit bandartig angeordneten hellgrünen Gewebepartien auf den Blättern. Auch hierbei dürfte es sich um eine Virose handeln.

Literaturverzeichnis

Baur, E., 1904: Zur Ätiologie der infektiösen Panaschierung. Ber. dtsch. bot. Ges. **22**, 453—460.

— —, 1906: Weitere Mitteilungen über die infektiöse Chlorose und über einige analoge Erscheinungen bei *Ligustrum* und *Laburnum*. Ber. dtsch. bot. Ges. **24**, 416—428.

— —, 1907: Über infektiöse Chlorosen bei *Ligustrum, Laburnum, Fraxinus, Sorbus* und *Ptelea*. Ber. dtsch. bot. Ges. **25**, 410—413.

— —, 1908: Über eine infektiöse Chlorose von *Evonymus japonicus*. Ber. dtsch. bot. Ges. **26 a**, 711—713.

Schmelzer, K., und H. O. Schmidt, 1959: Die Gelbnetzkrankheit der Forsythie. Phytopath. Z. **36**, 97—99.

Willison, R. S., and M. Weintraub, 1957: Properties of a strain of cucumber-mosaic virus isolated from *Prunus* hosts. Canad. j. bot. **35**, 763—771.

Besprechungen

Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem, Heft 98:

Butin, H., Die Krankheiten der Weide und deren Erreger. 1960, 46 Seiten mit 27 Abbildungen, kartoniert DM 5,40. Im Buchhandel zu beziehen durch den Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.

Um dem praktischen Bedürfnis nach einer übersichtlichen Zusammenstellung und genauen Beschreibung der verschiedenen den Weidenanbau bedrohenden Krankheiten Genüge zu tun, hat der Verfasser die in Deutschland an Weiden beobachteten Krankheitserreger sowie einige bisher nicht in Deutschland gefundene Schaderreger zusammengestellt und mit ihrem Schadbild eingehend beschrieben. Die meist guten Fotografien und sehr klaren Zeichnungen des mikroskopischen Bildes sind fast durchweg Originale nach frischem Material. Hinweise auf Verbreitung, Biologie, gegebenenfalls auch Sortenanfälligkeit und Bekämpfung sind in einzelnen Beschreibungen beigefügt. Besonders ausführlich sind die wichtigsten Pilzarten, nämlich *Venturia chlorospora* (Ces.) Adh., *Melampsora* spp. *Glomerella miyabeana* (Fuck.) v. Arx behandelt. Insgesamt sind drei Bakterienarten und 26 Pilzarten beschrieben. Die übersichtliche Darstellung des Heftes wird in der Praxis des Weidenanbaues wie bei den Pflanzenärzten sehr willkommen sein. FUCHS, Göttingen

Frauenstein, Käte, Falsche Mehltaupilze. Die Neue Brehm-Bücherei, Heft 233, 46 Seiten, 21 Abbildungen und 2 Übersichten. Verlag A. Ziemsen, Wittenberg-Lutherstadt, 1959.

In einer populärwissenschaftlichen Bücherserie wie „Die Neue Brehm-Bücherei" ist es leider nicht möglich, immer das gleiche Gesicht zu wahren. Um so erfreulicher ist die Bearbeitung der „Falschen Mehltaupilze" von FRAUENSTEIN, die sich würdig an die gleichwertigen Bändchen Nr. 172 (Rostpilze) und Nr. 216 (Brandpilze) schließt. Nach allgemeinen Hinweisen über die „systematische Stellung der Falschen Mehltaupilze", die Schadbilder, Morphologie, Entwicklungsgang und Bekämpfung werden die wichtigsten Vertreter eingehend behandelt. Die Darstellung ist klar und auch für Nichtfachleute verständlich, ohne etwa wissenschaftlich ungenau zu werden. Ausdrücke, wie „Gifte" sollte man allerdings für Fungizide vermeiden. Es läßt sich auch darüber streiten, ob man neue und seltenere Gattungen, wie *Dicksonomyces,* die nur erst aus Indien bekannt ist, in einer solchen Buchreihe nennen sollte. Die photographischen Abbildungen sind eindrucksvoll und die Zeichnungen neu gefertigt. Sie runden die Darstellung ab. Dem Büchlein ist eine weite Verbreitung zu wünschen. H. JOHANNES, Braunschweig

Frauenstein, Käte, Echte Mehltaupilze. Die Neue Brehm-Bücherei, Heft 234. 51 Seiten, 32 Abbildungen, broschiert DM 3,75. Verlag A. Ziemsen, Wittenberg-Lutherstadt, 1959.

In ähnlicher Weise wie bei den an gleicher Stelle bereits erschienenen Heften über Rostpilze, Brandpilze und Falsche Mehltaupilze werden hier die Echten Mehltaupilze in einer allgemeinverständlichen Form botanisch oder phytopathologisch interessierten Kreisen nähergebracht. Während die ersten Abschnitte (I—IV) einen allgemeinen Überblick über die systematische Stellung, Schadbilder, Morphologie und Entwicklungsgang sowie über Be-

kämpfung dieser interessanten Pilzgruppe vermitteln, sind in Abschnitt V die einzelnen Gattungen der *Erysiphaceae* mit ihren in unserem Gebiet vorkommenden Vertretern ihrer wirtschaftlichen Bedeutung entsprechend mehr oder weniger ausführlich dargestellt. Dabei ist die große Zahl an Abbildungen an sich begrüßenswert. Die Wiedergabe der Befallsbilder läßt jedoch zu wünschen übrig. Dieser Mangel kann aber nicht grundsätzlich den Wert dieses Heftchens, das auch einige Hinweise auf wichtige deutschsprachige Literatur und ein Namen- und Sachwortverzeichnis enthält, mindern.

Die ihm zugedachte sehr begrüßenswerte Aufgabe, einen möglichst großen Leserkreis mit den Echten Mehltaupilzen vertraut zu machen und damit gleichzeitig Verständnis für den Pflanzenschutz und die Arbeit des Phytopathologen zu wecken, dürfte dieses kleine Heft durchaus erfüllen.

GERLACH, Berlin-Dahlem

Moore, H. F., British Parasitic Fungi. University Press, Cambridge 1959. XVI + 430 Seiten, Preis 45 s.

Dieses Buch, das sehr klar und zweckmäßig gegliedert ist, stellt eine Übersicht über die auf Kulturpflanzen in Großbritannien vorkommenden parasitischen Pilze und die von ihnen verursachten Krankheiten dar.

Im ersten Teil werden die Wirtspflanzen nach ihren wissenschaftlichen Namen alphabetisch geordnet aufgeführt (zusätzlich sind auch die englischen Vulgärnamen angegeben) und die jeweils an diesen auftretenden pilzlichen Krankheitserreger genannt.

Der zweite Teil bringt eine alphabetische Liste der parasitischen Pilze, für die in der Regel die heute allgemein anerkannten und gültigen Namen verwendet werden. Daß daneben auch einige eingebürgerte Synonyme angegeben, Hinweise auf evtl. bekannte Haupt- und Nebenfruchtformen gebracht und wichtige Literaturstellen genannt werden, ist sehr zu begrüßen. Für jeden Parasiten werden die von diesem verursachten Pflanzenkrankheiten je nach ihrer Bedeutung mehr oder weniger ausführlich besprochen und auch diese Angaben durch Hinweise auf englische Literatur belegt. Der gegebene Überblick über die britischen Schadpilze ist noch dadurch vervollständigt, daß auch einige Myxomyceten, pflanzenpathogene Actinomyceten sowie die in der Champignon-Kultur schädigenden Pilze mit berücksichtigt worden sind.

Mit diesem Buch hat MOORE ein übersichtliches, sorgfältig zusammengestelltes und nicht nur für Pythopathologen und Mykologen zweifellos sehr nützliches Nachschlagewerk geschaffen, das trotz seines verhältnismäßig hohen Preises über Großbritannien hinaus auch in Deutschland und anderen Ländern mit ähnlichen klimatischen und pflanzenbaulichen Verhältnissen sehr willkommen sein wird und dem daher eine weite Verbreitung sicher sein dürfte.

GERLACH, Berlin-Dahlem

Soeben erschien:

Isotope in der Landwirtschaft

Methoden und Ergebnisse des Einsatzes radioaktiver und stabiler Isotope in der landwirtschaftlichen Forschung und Praxis

Von Dr. Hans Linser

Professor an der Techn. Hochschule Wien und Hochschule für Bodenkultur Wien. Leiter der Biolog. Forschung der Österr. Stickstoffwerke AG Linz. Mitarbeiter der Österr. Studiengesellschaft für Atomenergie in Wien

und Dr. Karl Kaindl

Dozent an der Universität Wien. Leiter des Isotopenlaboratoriums der Österr. Stickstoffwerke AG Linz. Mitarbeiter der Österr. Studiengesellschaft für Atomenergie in Wien

442 Seiten mit 214 Abbildungen und 105 Tabellen. In Ganzleinen DM 86,—

Zahlreiche Wissensgebiete haben bei ihren Forschungsaufgaben aus der Anwendung radioaktiver und stabiler Isotope als Hilfsmittel und aus dem Einsatz der radioaktiven Strahlung außerordentliche Vorteile ziehen können und zum Teil wesentliche neue Erkenntnisse gewonnen, die frühere Hypothesen überholten und durch neue, tragfähigere ersetzten. Das gilt ganz besonders für die Biochemie.

Auch die Landwirtschaft bedient sich immer stärker dieser Methodik, in erster Linie als Forschungsmittel, aber auch als brauchbares Hilfsmittel in der Praxis. So werden radioaktive Bestrahlungen nicht nur zur Wachstumsstimulierung und zur Erkennung geeigneter Zuchttiere erprobt, sondern auch zur Sterilisierung und Haltbarmachung von Nahrungsmitteln. Darüber hinaus ermöglichen die ionisierenden Strahlungen radioaktiver Isotope eine Fülle neuer Einblicke, z. B. auf den Gebieten des pflanzlichen und tierischen Stoffwechsels, der Bodenuntersuchung, der Düngeranwendung und der Schädlingsbekämpfung.

Fast alle Teilgebiete der Landwirtschaftswissenschaften sind von den Auswirkungen des Einsatzes von Isotopen betroffen. Infolgedessen brachten die letzten 15 Jahre eine solche Fülle wissenschaftlicher Arbeiten und Veröffentlichungen, daß für den einzelnen kaum noch ein Überblick gegeben ist. Bisher lag in deutscher Sprache noch keine Zusammenfassung und Auswertung der weit zerstreuten Kenntnisse und Erfahrungen auf dem landwirtschaftlichen Gebiet vor. Für den deutschen Sprachbereich wird deshalb mit dem vorliegenden Buch erstmalig der Versuch gemacht, Methodik und Ergebnisse des Einsatzes von Isotopen für die Landwirtschaft so zusammenzufassen und darzustellen, daß (nach dem Stand von 1959) eine Grundlage für alle gegeben ist, die sich über das Gesamtgebiet orientieren wollen.

Das gilt praktisch für alle Bereiche der Landwirtschaft, von der Bodenkunde und Bodenbearbeitung bis zur Pflanzenzüchtung und Tierzüchtung, Düngung, Pflanzenernährung und Tierernährung sowie für alle Grenzgebiete der industriellen Verarbeitung landwirtschaftlicher Produkte, ferner der Versorgung mit landwirtschaftlichen Hilfsstoffen, wie Düngemittel, Pflanzenschutzmittel, Futtermittel, Konservierungs- und Hilfsmittel für die landwirtschaftliche Veredlung u. a. m.

VERLAG PAUL PAREY / HAMBURG UND BERLIN

Nematoden der Kulturpflanzen Europas

Von Dr. H. GOFFART

1951. 144 Seiten mit 91 Abbildungen. Ganzleinen DM 18,—

Das Buch stellt eine umfassende deutschsprachige Veröffentlichung auf dem Gebiet der Nematodenforschung dar. Praxis und Wissenschaft erhalten durch dieses auf Grund jahrzehntelanger Beobachtungen geschaffene Werk eine klare Übersicht über die wichtigsten Arten der Nematoden und die durch sie hervorgerufenen Schäden an den verschiedenen Kulturpflanzen. Ein ausführliches Schrifttumsverzeichnis sowie alphabetische Zusammenstellungen der berücksichtigten Pflanzen und der aufgeführten Nematoden erhöhen die Übersichtlichkeit des Werkes.

„So sind Gründlichkeit, klarer und übersichtlicher Aufbau ein Kennzeichen dieses Buches, das den Niederschlag der 25jährigen Forschungsarbeit und praktischen Erfahrung eines unserer besten Nematodenspezialisten darstellt. Das Buch ist insbesondere für alle im Pflanzenschutz Tätigen, aber auch für den interessierten Landwirt, Pflanzenzüchter und Biologen eine willkommene Bereicherung seiner Fachliteratur. Es sollte deshalb in keiner Handbibliothek fehlen." *Nachrichtenblatt des deutschen Pflanzenschutzdienstes*

Neuerscheinung:

Leitfaden des Pflanzenschutzes im Obst- und Gemüsebau

Von Prof. Dr. W. KOTTE, Freiburg i. Br.

1960. 136 Seiten mit 98 Abbildungen. Kartoniert DM 9,80

In seiner prägnanten Kürze und Übersichtlichkeit, die ein sicheres Erkennen und Bekämpfen von Krankheiten und Schädlingen gewährleistet, ist dieser Leitfaden der ideale Ratgeber. Der erste Teil des Buches enthält in leichtverständlicher Form eine allgemeine Darstellung der Ursachen der wichtigsten Krankheiten an Obstgewächsen und Gemüsepflanzen sowie der Verhütungsmaßnahmen einschließlich der Anwendungsmöglichkeiten neuzeitlicher Pflanzenschutzgeräte. Der zweite Teil befaßt sich mit den Krankheiten und Schädlingen an den Pflanzen, indem die Schäden beschrieben werden und ihre Bekämpfung im einzelnen aufgezeigt wird. Zahlreiche Abbildungen ermöglichen das sichere Erkennen aller Erkrankungen.

VERLAG PAUL PAREY · BERLIN UND HAMBURG